

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CLARA SANS SALOMÃO BRUNOW VENTURA

EFEITO CICATRIZANTE TÓPICO DO ÓLEO EXTRAÍDO DAS SEMENTES DE
Moringa oleifera Lam.: UM ESTUDO EM CAMUNDONGOS

CURITIBA

2021

ANA CLARA SANS SALOMÃO BRUNOW VENTURA

EFEITO CICATRIZANTE TÓPICO DO ÓLEO EXTRAÍDO DAS SEMENTES DE
Moringa oleifera Lam.: UM ESTUDO EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela de Almeida Cabrini

Co-orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Ventura, Ana Clara Sans Salomão Brunow

Efeito cicatrizante tópico do óleo extraído das sementes de *Moringa oleifera* Lam.: um estudo em camundongos. / Ana Clara Sans Salomão Brunow Ventura. – Curitiba, 2021.

89 p.: il.

Orientadora: Daniela de Almeida Cabrini.

Coorientador: Michel Fleith Otuki

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Cicatrização. 2. Pele - inflamação. 3. *Moringa oleifera*. 4. Ácidos graxos. 5. Diabetes. 6. Imunossupressão. I. Título. II. Cabrini, Daniela de Almeida, 1970-. III. Otuki, Michel Fleith. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 571.975

ATA Nº300

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM FARMACOLOGIA

No dia vinte e dois de abril de dois mil e vinte e um às 15:00 horas, na sala Teams, On line pelo Teams, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese da doutoranda **ANA CLARA SANS SALOMÃO BRUNOW VENTURA**, intitulada: **Efeito cicatrizante tópico do óleo extraído das sementes da *Moringa oleifera*: um estudo em camundongos**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: DANIELA DE ALMEIDA CABRINI (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), ALEXANDRA ACCO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), BRUNA DA SILVA SOLEY (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), ARTHUR DA SILVEIRA PRUDENTE (UNIVERSITY OF CINCINNATI). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutor está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, DANIELA DE ALMEIDA CABRINI, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 22 de Abril de 2021.

Assinatura Eletrônica

10/08/2021 16:00:26.0

DANIELA DE ALMEIDA CABRINI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

10/08/2021 14:53:36.0

ALEXANDRA ACCO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

10/08/2021 14:48:38.0

BRUNA DA SILVA SOLEY

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

10/08/2021 14:47:30.0

ARTHUR DA SILVEIRA PRUDENTE

Avaliador Externo (UNIVERSITY OF CINCINNATI)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANA CLARA SANS SALOMÃO BRUNOW VENTURA** intitulada: **Efeito cicatrizante tópico do óleo extraído das sementes da *Moringa oleifera*: um estudo em camundongos**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 22 de Abril de 2021.

Assinatura Eletrônica

10/08/2021 16:00:26.0

DANIELA DE ALMEIDA CABRINI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

10/08/2021 14:53:36.0

ALEXANDRA ACCO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

10/08/2021 14:48:38.0

BRUNA DA SILVA SOLEY

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

10/08/2021 14:47:30.0

ARTHUR DA SILVEIRA PRUDENTE

Avaliador Externo (UNIVERSITY OF CINCINNATI)

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Daniela de Almeida Cabrini e Michel Fleith Otuki por terem me aceitado uma segunda vez no seu laboratório, pela dedicação dispensada a este trabalho e pelos valiosos ensinamentos proporcionados durante a minha formação acadêmica;

À Ananda Beatriz Cretella pela apresentação do óleo das sementes de *Moringa oleifera* à equipe do laboratório;

À Prof^a. Dr^a. Carolina Camargo de Oliveira e à Jenifer Gonçalves Pendiuk pela contribuição com a padronização do protocolo de imunossupressão e pela atenção dedicada a este trabalho;

Aos membros da banca examinadora pela leitura e colaboração para a finalização deste trabalho;

Aos meus pais Antonio e Silvia Salomão e a minha irmã Bianca Sans Salomão pelo incentivo irrestrito, amor incondicional, apoio e consolo nos momentos difíceis;

As minhas filhas Sofia e Alice Sans Ventura simplesmente por existirem;

Ao Henrique Ventura pelo apoio absoluto e pelo auxílio prestado inúmeras vezes durante esse período;

À Thalita de Paula pela assistência, apoio e pela amizade;

Ao Fernando Zonzini pela parceria na elaboração da revisão sistemática acerca da influência do ácido oleico sobre os leucócitos;

À Cintia Delai da Silva Horinuchi por ser parte importante na minha iniciação acadêmica e pela amizade mesmo que distante;

Aos meus colegas de laboratório e de trajetória acadêmica Bruna Soley, Priscila Pawloski, Fernanda Grillo, Margareth Brandenburg, Angélica Hillman, Juliana Ferreira, Kaue Justo, Kelly Alencar, Andressa Hiekis, Caroline Dadalt, Gabriela Ferreira e Maria Lúcia Jorge;

Aos professores do Departamento de Farmacologia pelos conhecimentos compartilhados;

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia pelos serviços prestados;

Aos funcionários do Biotério do Setor de Ciências Biológicas pelos serviços prestados;

Aos camundongos que possibilitaram este trabalho;

À CAPES pelo financiamento da minha bolsa de doutorado;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Somente quando se consegue fazer do conteúdo do mundo, o conteúdo do seu próprio pensar, o ser humano reencontra a unidade da qual ele mesmo se desligou”.

A Filosofia da Liberdade

Rudolf Steiner

RESUMO

O óleo extraído das sementes da árvore *Moringa oleifera* Lam. é popularmente utilizado para fins dermatológicos. Embora existam evidências da ação cicatrizante de seu composto majoritário, ácido oleico (AO), o potencial do óleo como tratamento de feridas cutâneas ainda não foi devidamente investigado. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do óleo das sementes de *Moringa oleifera* (OSMO) e do AO na cicatrização aguda e crônica de feridas na pele. Para tal, camundongos Swiss saudáveis, diabéticos e imunossuprimidos foram submetidos ao modelo de excisão cutânea. Cada ferida foi diariamente medida, fotografada e tratada por via tópica com a aplicação do OSMO, AO, óleo mineral (veículo para AO) e Dersani® (controle positivo). As taxas de fechamento das feridas foram calculadas, bem como foram obtidas amostras para análises histológicas, imunohistoquímicas e para a mensuração de colágeno. Ambas as condições patológicas prolongaram o tempo habitual de fechamento das feridas, o que foi revertido pelo tratamento com OSMO e AO. Apesar de os tratamentos não terem alterado a quantificação da celularidade na fase inflamatória da cicatrização, na fase proliferativa, os níveis do aminoácido hidroxiprolina, componente específico do colágeno, se mostraram superiores nas feridas de animais diabéticos e imunossuprimidos tratados com OSMO e AO. Em concordância, o conteúdo de colágeno corado com tricrômio de Mallory se apresentou elevado em feridas diabéticas tratadas com OSMO e AO em relação ao controle diabético não tratado. A quantidade de miofibroblastos, subpopulação de fibroblastos responsáveis pela contração da ferida, estava reduzida em diabéticos e imunossuprimidos, contudo foi reestabelecida por ambos os tratamentos. Sendo assim, sugere-se que o uso tópico do OSMO facilita o fechamento de feridas fisiológicas e crônicas, acelerando o processo de cicatrização e atuando sobre o conteúdo de colágeno. Além disso, é possível que o AO seja o componente do OSMO responsável pelo efeito cicatrizante. Investigações adicionais seriam importantes para esclarecer os mecanismos envolvidos nesse efeito e determinar a segurança destes tratamentos.

Palavras-chave: “inflamação”, “ben oil”, “ácidos graxos”, “pele”, “diabetes”, “imunossupressão”.

ABSTRACT

Though the oil rich in oleic acid (OA) extracted from the seeds of the medicinal tree *Moringa oleifera* is popularly used for skin purposes and its major compound is known for its healing effect, its wound healing potential has never been investigated. In this way, the aim of this study was to evaluate the *Moringa oleifera* seeds oil (OSMO) and OA effect on regular physiological and chronic skin wound healing. To achieve this purpose, healthy, diabetic (streptozotocin i.p., 80 mg/Kg, daily for three days) and immunosuppressed (dexamethasone i.m., 1 mg/Kg, daily for 17 days) Swiss mice were submitted to a model of skin excision (6 mm). Each wound was measured once a day, photographed and submitted to topical application of OSMO, OA, mineral oil (vehicle for OA) or Dersani© (positive control) until the wound closure. Closure rate, histology and measurement of tissue collagen were processed. Both pathological conditions, immunosuppression and diabetes, prolonged wound closure, when compared to healthy mice. When applied on wounds of healthy mice, MOSO and specially OA caused a faster closure. Treatment with MOSO and OA also shortened significantly the healing time in chronic wounds. Despite the treatments did not alter skin cellularity in the inflammatory phase of wound healing, the collagen amino acid hydroxyproline levels were higher in immunosuppressed and diabetic wounds treated with MOSO and OA on the 7th day after excision. Collagen content stained with Mallory's trichrome showed improvement by MOSO and OA in diabetic wound, but only OA increased collagen in healthy wounds. Myofibroblast quantification, reduced in immunosuppressed and diabetic wounds, was also reestablished by both treatments. So, it is possible that the topical use of MOSO may facilitate acute physiological and chronic wounds, accelerating the healing process and acting on collagen content. Besides, OA might be the oil compound responsible for the wound healing efficacy. Further investigations are needed in order to clear the mechanisms involved with these effects and determine the security of the treatments for wound healing.

Keywords: "inflammation", "ben oil", "fatty acids", "skin", "diabetes", "imunnosuppression".

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ÁREA DE UMA FERIDA CUTÂNEA NO DESENCADEAMENTO DA CICATRIZAÇÃO	22
FIGURA 2 - IMAGEM DAS PARTES DA ÁRVORE <i>MORINGA OLEIFERA</i> LAM.	29
FIGURA 3 - IMAGEM DAS SEMENTES DE <i>M. OLEIFERA</i> LAM.	30
FIGURA 4 - IMAGEM DOS FRUTOS ENLATADOS COMERCIALIZADOS DE <i>MORINGA OLEIFERA</i> LAM.	31
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DA MOLÉCULA DO AO	34
FIGURA 6 - ESQUEMA DE TRATAMENTOS UTILIZADO NO ESTUDO	39
FIGURA 7 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	40
FIGURA 8 - PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DOS CAMUNDONGOS IMUNOSSUPRIMIDOS	43
FIGURA 9 - EFEITO DO OSMO E AO NA TAXA DE FECHAMENTO DA EXCISÃO CUTÂNEA	44
FIGURA 10 - IMAGENS REPRESENTATIVAS DO EFEITO DO OSMO E AO NA TAXA DE FECHAMENTO DA EXCISÃO CUTÂNEA	45
FIGURA 11 - EFEITO DO OSMO E OA SOBRE A CICATRIZAÇÃO IMUNOSSUPRIMIDA	47
FIGURA 12 - IMAGENS REPRESENTATIVAS DO EFEITO DO OSMO E OA SOBRE A CICATRIZAÇÃO IMUNOSSUPRIMIDA	48
FIGURA 13 - EFEITO DO OSMO E OA SOBRE A CICATRIZAÇÃO DIABÉTICA	49
FIGURA 14 - IMAGENS REPRESENTATIVAS DO EFEITO DO OSMO E OA SOBRE A CICATRIZAÇÃO DIABÉTICA	50
FIGURA 15 - INFLUÊNCIA DE OSMO E AO NOS NÍVEIS DE HIDROXIPROLINA	52
FIGURA 16 - EFEITO DO OSMO E AO NA QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO	54
FIGURA 17 - IMAGENS REPRESENTATIVAS DO EFEITO DO OSMO E AO NA QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO ORIUNDO DA CICATRIZAÇÃO AGUDA	56

FIGURA 18 - IMAGENS REPRESENTATIVAS DO EFEITO DO OSMO E AO NA QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO ORIUNDO DA CICATRIZAÇÃO IMUNOSSUPRIMIDA	57
FIGURA 19 - IMAGENS REPRESENTATIVAS DO EFEITO DO OSMO E AO NA QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO ORIUNDO DA CICATRIZAÇÃO DIABÉTICA	59
FIGURA 20 - EFEITO DO OSMO E AO NA SOBRE OS MIOFIBROBLASTOS NA FASE PROLIFERATIVA	61
FIGURA 21 - IMAGENS REPRESENTATIVAS DO EFEITO DO OSMO E AO SOBRE OS MIOFIBROBLASTOS NA FASE PROLIFERATIVA	63
FIGURA 22 - EFEITO DO OSMO E AO SOBRE A CELULARIDADE NA FASE INFLAMATÓRIA	65
FIGURA 23 - IMAGENS REPRESENTATIVAS DO EFEITO DO OSMO E AO SOBRE A CELULARIDADE NA FASE INFLAMATÓRIA	66
FIGURA 24 - RESUMO GRÁFICO DA RELEVÂNCIA DO ESTUDO	77

LISTA DE ABREVIATURAS

α -SMA	α -actina de músculo liso
AA	Ácido araquidônico
a.C.	Antes de Cristo
AO	Ácido oleico
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Ativador de proteína-1
ARG1	Arginase 1
ARRIVE	Animal research: reporting <i>in vivo</i> experiments
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
C9	Carbono 9
CCL	Quimiocina CCL
CCR	Receptor de quimiocina CC
CD	Cluster de diferenciação
CEUA/BIO	Comitê de Ética para uso Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná
cMoL	Lectina coagulante de <i>M. oleifera</i>
COX	Ciclooxigenase
CX3CL-1	Fractalquina
CX3C	Receptor de quimiocina CXC
CXC	Quimiocina CXC
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de crescimento endotelial
EPM	Erro padrão da média
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
GLUT	Receptor proteína transportadora de glicose
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos
H&E	Hematoxilina e eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HMGB-1	Proteína do grupo 1 de mobilidade alta

HRP	Horseradish peroxidase
HYP	Hidroxiprolina
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
IL1-RA	Antagonista do receptor de interleucina-1
JAK	Janus quinase
KGF	Fator de crescimento de queratinócito
Lam.	Lamarck
LCs	Células de langerhans
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB4	Leucotrieno B4
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MIP-3 α	Proteína inflamatória de macrófagos-3 α
MMP	Metaloproteases de matriz
MOSO	<i>Moringa oleifera</i> seeds oil
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaOH	Hidróxido de sódio
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NF-kB	Fator nuclear-kB
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OSMO	Óleo das sementes de <i>Moriga oleifera</i>
P2R	Receptor purinérgico
PBS	Tampão fosfato salino
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PF4	Fator de plaquetas 4
PI	Iodeto de propídio
PPAR γ	Receptor ativado por proliferador de peroxissomo γ
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SMAD	Sinais de transdução como mães contra o homólogo

	decapentalgico
sp.	Gênero com espécie não identificada
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
STING	Proteína adaptadora estimuladora do gene interferon
STZ	Estreptozotocina
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Fator de crescimento transformador
TIMP	Inibidor de metaloprotease
TLR	Receptor toll-like
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

±	Acréscimo do erro padrão da média
α	Alfa
β	Beta
cm	Centímetro
\$	Dólares
γ	Gama
g	Gramas
°C	Grau Celsius
h	Horas
κ	Kappa
£	Libras
®	Marca registrada
<	Menor
m	Metro
ug/mL	Micrograma/mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
mg/dL	Miligrama/decilitro
mg/Kg	Miligrama/quilograma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mol/L	Mol/litro
M	Molar
nm	Nanômetro
%	Porcentagem
pH	Potencial hidrogeniônico
x	Vez

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2. JUSTIFICATIVA.....	36
3. OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 AQUISIÇÃO DE OSMO E AO	37
4.2 ANIMAIS	38
4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TECIDUAL DE HIDROXIPROLINA (HYP).....	41
4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA	42
4.8 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	42
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5. RESULTADOS	43
5.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM OSMO E AO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	44
5.3 EFEITO DO OSMO E DO AO NO CONTEÚDO DE HYP	51
5.4 EFEITO DE OSMO E AO SOBRE O CONTEÚDO DE COLÁGENO ANALISADO POR HISTOLOGIA.....	54
5.5 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM OSMO E AO SOBRE CÉLULAS A-SMA POSITIVAS.....	60
5.6 INFILTRAÇÃO CELULAR NO 2º DIA APÓS EXCISÃO	64
6. DISCUSSÃO.....	67
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
REFERÊNCIAS.....	78

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 CICATRIZAÇÃO

Durante o processo evolutivo, as células perderam características necessárias à sobrevivência independente e adquiriram peculiaridades que serviram às necessidades de sobrevivência do organismo como um todo (ALBERTS *et al.*, 2010). A pele é composta por diversos tipos celulares distribuídos entre três camadas principais, epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é constituída principalmente por queratinócitos, células secretoras de queratina, em diferentes estágios de diferenciação: na camada basal, as células estão se dividindo e migrando para a próxima camada, o estrato espinhoso, onde se diferenciam em células ricas em desmossomos; ao atingir o estrato granuloso, as células tornam-se finas e firmemente unidas, formando uma barreira impermeável. A partir dessa camada, elas perdem seu núcleo e suas organelas e tornam-se células escamosas queratinizadas do estrato córneo, principal barreira à absorção percutânea de fármacos e à perda de água corpórea (ALBERTS *et al.*, 2010). A derme é constituída principalmente por fibroblastos, células secretoras de colágeno e outros componentes da matriz extracelular (MEC). A sua camada superior, denominada camada papilar, é composta por tecido conjuntivo frouxo, serve como apoio e, por conter vasos sanguíneos, é fonte de nutrientes e calor para as células da epiderme. A camada mais profunda, denominada camada reticular, possui tecido conjuntivo mais denso e organizado (IRION, 2005; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2005). Os componentes da derme incluem colágenos, glicoproteínas, proteoglicanos e fibras elásticas, sendo essas últimas presentes principalmente na derme reticular e não totalmente formadas na derme papilar (WOODLEY, 2017). Essa organização das fibras colágenas e elásticas na derme determina a tensão e elasticidade da pele. A hipoderme é composta por adipócitos e realiza, dentre outras funções, manutenção da temperatura corporal. Dessa forma, cada tipo celular desempenha uma função distinta a fim de contribuir para que a pele atue como uma barreira entre o organismo e o ambiente.

Uma lesão que comprometa a função da pele desencadeia uma complexa sequência ordenada de reações e interações entre moléculas e

células com o objetivo da restauração da integridade estrutural e funcional da pele, em um processo denominado cicatrização. A pele humana cicatriza de forma reparativa, produzindo ao final do processo uma cicatriz sobre o espaço previamente lesionado, porém sem conseguir formar novas unidades pilossebáceas ou outros apêndices cutâneos (WOODLEY, 2017), já que a tendência evolucionária foi alcançar um reparo tecidual rápido com a utilização do menor gasto de energia possível. No entanto, esse padrão evolutivo não se aplica às feridas com anormalidades patofisiológicas, como as úlceras diabéticas, que apresentam cronicidade na cicatrização e desregulação da sincronidade e progressão de eventos envolvidos na cicatrização (FALANGA, 2005).

Para simplificar o estudo acerca do processo de cicatrização, este foi didaticamente dividido em três fases distintas e sobrepostas, denominadas inflamação, proliferação e remodelamento. Inicialmente, o dano nas células cutâneas induz uma rápida liberação de cálcio, o que ativa a enzima fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH oxidase), responsável por mediar a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, dessa forma, mobilizar células do sistema imunológico para o local. Em monócitos e macrófagos, o H_2O_2 induz a liberação da proteína 1 do grupo de alta mobilidade (HMGB-1), potente mediador da inflamação sistêmica. Além do HMGB-1, outros padrões moleculares associados a danos (DAMPs), como a adenosina trifosfato (ATP), reconhecida pelos receptores purigênicos proinflamatórios P2RY e P2RX, desencadeiam a ativação de macrófagos residentes no tecido (MINUTTI *et al.*, 2017). Em concomitante, se houver ruptura de vasos sanguíneos, ocorrerá vasoconstrição local e o endotélio capilar e as plaquetas ativarão a cascata de coagulação e a consequente formação do tampão, de forma a endossar a inflamação, evitar a perda excessiva de líquidos, células e proteínas e dificultar a entrada de microorganismos (BROUGHTON *et al.*, 2006).

O tampão consiste de plaquetas embebidas em uma trama de fibrinogênio polimerizado pela ação da trombina, ou seja, em uma trama de fibrina, fibronectina, vitronectina e trombospondina. Além das plaquetas, hemáceas e leucócitos, e até mesmo colágeno, podem estar presentes no tampão (WITTE e BARBUL, 1999; RODERO e KHOSROTEHTANI, 2010). A atividade inflamatória do tampão resulta da polimerização da fibrina em fragmentos denominados fibrinopeptídeos A e B, com função quimioatrativa

para células inflamatórias e da secreção de citocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformador- β 1 (TGF- β 1), que mobilizam células do sistema imunológico para a área lesionada. A ruptura dos vasos sanguíneos locais também desencadeia hipóxia no tecido, o que estimula nas células endoteliais a transcrição e síntese de citocinas e fatores de crescimento como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), PDGF e TGF- β 1, promovendo a angiogênese, a proliferação e expansão clonal dos fibroblastos na derme e a migração dos queratinócitos na epiderme (FALANGA, 2005).

A reepitelização, devido à migração e proliferação dos queratinócitos, é fundamental para a oclusão da ferida e a restauração da integridade cutânea. O processo ocorre de forma organizada, sendo alimentado por células tronco da camada basal e dos apêndices pilosos. Há uma zona específica de migração na borda da ferida e, em uma região mais externa, uma zona específica de proliferação de queratinócitos (ARAGONA *et al.*, 2017). Em contrapartida, a proliferação e expansão clonal dos fibroblastos têm importância para a posterior síntese de proteínas da MEC e a promoção da angiogênese possibilita a distribuição de oxigênio e nutrientes para as células envolvidas na cicatrização. Em resposta aos estímulos quimiotáticos como Interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), TGF- β , fator de plaquetas 4 (PF4) e produtos de bactérias, os leucócitos nos vasos sanguíneos preservados, dilatados pela ação de mediadores inflamatórios e prostaglandinas, são desacelerados através da expressão endotelial de selectinas, ligados às integrinas e realizam diapedese para alcançar o tecido lesionado (MARTIN, 1997; POHLMAN *et al.*, 1986; BEVILACQUA *et al.*, 1985).

Contrapondo o conceito preestabelecido de que primeiramente os neutrófilos e a seguir, após 24 a 48 h, os monócitos migrariam para o tecido, Rodero e Khosrotehtani (2010) postularam que há uma onda inicial de monócitos migrando para a ferida, a partir dos vasos sanguíneos rompidos, em conjunto com os neutrófilos. Esses monócitos se diferenciariam em macrófagos e juntariam-se aos macrófagos residentes no tecido, células de langerhans (LCs) e macrófagos dérmicos, para exercer funções de indução da diferenciação e proliferação celular, da deposição de MEC e controle da inflamação (MINUTTI *et al.*, 2017). Os neutrófilos combatem a contaminação bacteriana e digerem o tecido não viável ao liberar proteases e radicais livres

(BROUGHTON *et al.*, 2006). Em uma resposta inflamatória exacerbada, os neutrófilos podem danificar o tecido sadio, devido a sua ação inespecífica (YAGER, 1999). Logo após a infiltração de neutrófilos, cerca de 24 a 48 h após a lesão, estes sofrem apoptose, liberando quimiocinas importantes para o recrutamento de monócitos e macrófagos ao local lesionado (RODERO e KHOSROTEHTANI, 2010).

Duas populações de monócitos infiltram a área da ferida: uma que expressa o receptor de quimiocina CCR-2 (equivalente ao cluster de diferenciação 14 – CD14 – dos monócitos humanos), e outra que expressa o receptor de quimiocina CX3CR-1 (equivalente ao CD16 dos monócitos humanos). Apesar de não se conhecer o destino celular exato de cada uma das populações, sabe-se que parecem contribuir distintamente para a cicatrização, visto que monócitos que expressam CCR-2 são predominantemente recrutados nos primeiros dias após a lesão, enquanto que a ausência de CX3CR-1 prejudica somente as fases mais tardias do processo (MINUTTI *et al.*, 2017).

Os macrófagos na lesão podem ser divididos em subpopulações distintas, denominadas fenótipo pró-inflamatório M1 e fenótipo anti-inflamatório M2. Apesar de facilitar a organização de muitos conceitos envolvidos no processo, essa classificação é rígida e a observação do contexto é essencial para entender o papel de cada população de macrófagos nas diferentes condições patofisiológicas. Em geral, ligantes do receptor toll-like (TLR), como estímulo microbiano (por exemplo, lipopolisacarídeos - LPS) ou citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos - GM-CSF) e interferon γ (IFN γ) ativam macrófagos M1. Sua polarização via sinalização por IFN γ é mediada pela proteína adaptadora estimuladora do gene interferon (STING) (CUI *et al.*, 2014). Enquanto que o fenótipo alternativo M2 pode ser ativado por IL-4 e IL-13 ou ainda pelo antagonista do receptor de interleucina-1 (IL1-RA) (MACLEOD e MANSBRIDGE, 2016). Os macrófagos M1 são os primeiros a atuarem na cicatrização. Eles promovem respostas inflamatórias por serem produtores eficientes de espécies reativas de oxigênio (ROS) e intermediários de nitrogênio, além de secretarem citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-12 e IL-6) (MANTOVANI *et al.*, 2013; MACLEOD e MANSBRIDGE, 2016). Essas células expressam óxido nítrico sintase (NOS) e, pela ação da IL-1 e TNF- α ,

produzem óxido nítrico (NO). O NO possui atividade antimicrobiana e promove vasodilatação e angiogênese (BLECHER *et al.*, 2012), contribuindo com ação vasodilatadora e de aumento da permeabilidade vascular da histamina. Além disso, macrófagos M1 também apresentam indução de ciclo-oxigenase 2 (COX2) e COX1. Já os macrófagos M2 não produzem NO e apresentam superregulação de COX1 (MANTOVANI *et al.*, 2013). Essas células expressam altos níveis de arginase 1 (ARG1), enzima que converte arginina em ornitina, precursor na síntese dos constituintes centrais do colágeno, prolina e hidroxiprolina. A ornitina também alimenta a via biossintética das poliaminas, necessária para proliferação celular e compete com a NOS pelo substrato arginina, suprimindo respostas inflamatórias (MINUTTI *et al.*, 2017).

Sendo assim, uma vez que a inflamação não seja mais necessária, ela deve ser resolvida para que as fases subseqüentes possam acontecer e, dessa forma, macrófagos M1 são polarizados para macrófagos M2, com função anti-inflamatória e de reparação tecidual. Um dos primeiros passos para o início da resolução da inflamação e para a formação de tecido novo é a fagocitose, por macrófagos, dos neutrófilos que entraram em apoptose (MINUTTI *et al.*, 2017). A polarização é influenciada por diferentes citocinas e quimiocinas, como a quimiocina CCL2 e a quimiocina CXCL14 (MANTOVANI *et al.*, 2012), e vias de sinalização. A via do receptor ativado por proliferador de peroxissomo γ (PPAR γ), regulada por pequenas moléculas lipofílicas, tem papel importante no evento, bem como a via do transdutor de sinal e ativador de transcrição 6 (STAT6). Já a inversão da polarização, a partir de M2 para o sentido M1, é facilitada pelo fator de transcrição fator nuclear κ -B (NF- κ B) (YUNNA *et al.*, 2020; GANESH *et al.*, 2020). Os macrófagos M2 demonstram alta taxa de fagocitose e capacidades variáveis de produção de citocinas anti-inflamatórias dependendo do sinal indutor, contudo, geralmente secretam IL-10 e TGF- β , sendo este último fator de crescimento, além de anti-inflamatório, promotor de proliferação e de diferenciação celular (YUNNA *et al.*, 2020; MACLEOD e MANSBRIDGE, 2016 e MINUTTI *et al.*, 2017). Ainda, fagócitos mononucleares são fonte de mediadores lipídicos, também envolvidos na resolução da inflamação (MANTOVANI *et al.*, 2013). Apesar de todas as populações de macrófagos M2 serem consideradas anti-inflamatórias, muitas vezes elas apresentam diferentes modos de ativação, perfil variável de secreção de citocinas e distintos mecanismos celulares, sendo classificadas em M2a

(ativadas por IL-4 e IL-13), M2b (formam complexos imunes com IL-1 β ou LPS), M2c (liberam IL-10 e TGF- β) e M2d (secretam predominantemente IL-10 ou VEGF) (GANESH *et al.*, 2020).

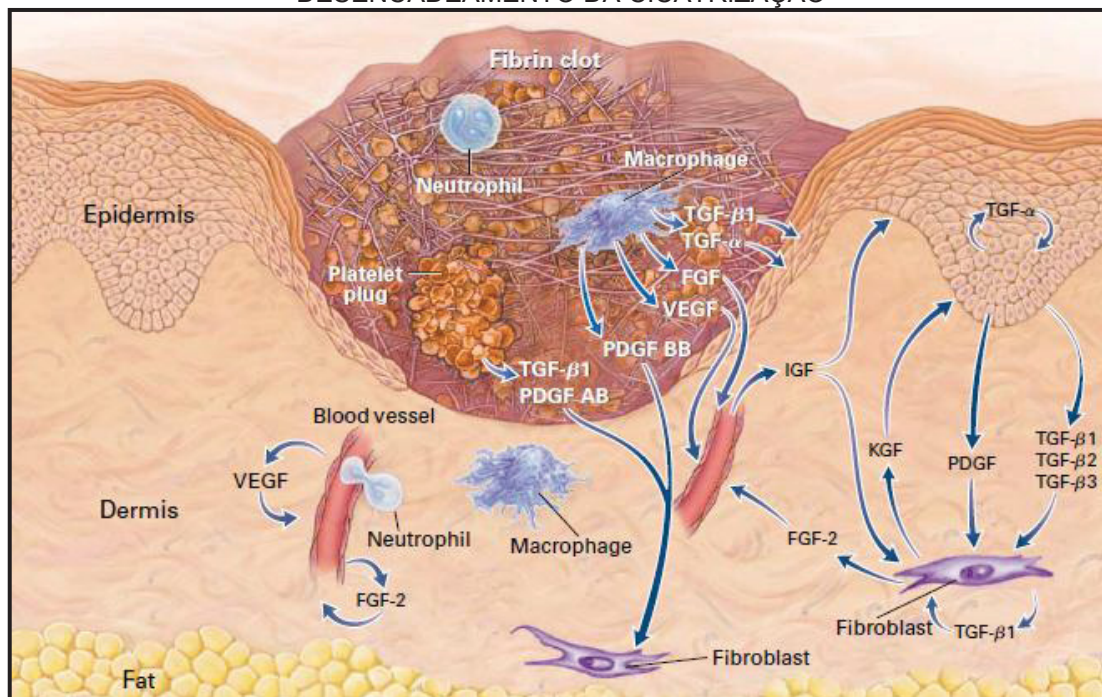
Portanto, o papel dos macrófagos na cicatrização ultrapassa o de indução da inflamação e de fagocitose de neutrófilos, bactérias e material celular desvitalizado. Eles medeiam a angiogênese ao sintetizar TNF- α e VEGF, induzem a digestão de membranas basais para facilitar a angiogênese ao sintetizar fator de crescimento fibroblástico (FGF) e estimulam a fibroplasia ao sintetizar TGF- β , fator de crescimento endotelial (EGF), PDGF, IL-1 e TNF- α (BROUGHTON *et al.*, 2006). Assim, os vasos sanguíneos trazem oxigênio e nutrientes para sustentar o metabolismo celular e os fibroblastos ativados produzem a nova MEC, necessária para o apoio das células em proliferação e migração (SINGER e CLARK, 1999). Dois a três dias após a indução da lesão, células progenitoras dos fibroblastos oriundas da medula óssea, conhecidas como fibrócitos, migram através da circulação sanguínea para ferida (KAO *et al.*, 2011; SMITH *et al.*, 2019) e, ao chegarem são ativadas e em resposta ao PDGF e EGF e passam a sintetizar grande parte das proteínas e polissacarídeos que compõem a neomatriz extracelular, como o colágeno III, a elastina, a fibronectina, a laminina e uma infinidade de glicosaminoglicanos (BROUGHTON *et al.*, 2006). Essa mesma função é exercida por fibroblastos do tecido, embebidos na MEC fisiológica, ativados por hipóxia, estresse oxidativo ou por quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento como PDGF, EGF, TGF- β , FGF, que além de induzir a síntese de componentes da MEC, estimulam proliferação celular, migração, diferenciação e controle da degradação de proteínas na MEC (SMITH *et al.*, 2019).

Os fibroblastos da derme são divididos em duas linhagens celulares: uma linhagem presente na derme papilar e a outra, na reticular. Cada linhagem apresenta marcadores celulares distintos e podem realizar funções específicas, sendo que os fibroblastos da linhagem reticular parecem ser os mais envolvidos na cicatrização da pele (WOODLEY, 2017). Até três ou quatro dias após a indução da lesão, os fibroblastos permanecem em estado de repouso, mas, ao tornarem-se ativados, as suas subunidades de integrinas se modificam a fim de aprimorar a eficiência da migração através da matriz primária rica em fibrina (FALANGA, 2005). Ainda durante esse período, aparecem os miofibroblastos, que podem derivar de fibroblastos do tecido conectivo ao redor

da ferida, células tronco mesenquimais, fibrócitos ou células epiteliais. Além de PDGF, TGF- β 1 e TGF- β 2, o aumento da rigidez da MEC pode estimular essa diferenciação dos miofibroblastos, células responsáveis pela contração do tecido de granulação da ferida, formado por fibroblastos e macrófagos. Por apresentarem em seu citoplasma um aparato contrátil, formado por feixes de microfilamentos α -actina de músculo liso (α -SMA) associados à miosina e a integrinas transmembrânicas, a força gerada pelo estresse das fibras intracelulares pode ser transmitida para os componentes da MEC, ocasionando a contração do tecido de granulação e a consequente oclusão da ferida (TOMASEK *et al.*, 2002). Ao final do processo, os miofibroblastos entram em apoptose e são repostos por fibroblastos com capacidade reduzida de secreção de componentes da MEC (BROUGHTON *et al.*, 2006, SMITH *et al.*, 2019). A matriz extracelular danificada é limpa pela ação das metaloproteases de matriz (MMPs), proteínas expressas por células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos, monócitos e macrófagos em resposta à liberação de TNF- α (SINGER e CLARK, 1999; BROUGHTON *et al.*, 2006). Sendo assim, a atividade das MMPs facilita a migração celular pela matriz, fundamental para a fibroplasia, angiogênese e migração de queratinócitos (GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2007). Os colágenos IV e VII, componentes essenciais da membrana basal e das fibrilas de ancoragem celular, são degradados pela MMP9, enquanto outros componentes da MEC não colagenosos são degradados pela MMP10. O arranjo dos hemidesmossomos que ancoram os queratinócitos à membrana basal é afrouxado pela ação de fatores de crescimento e MMPs. Horas após a indução da lesão, os queratinócitos começam a proliferar e migrar (FALANGA, 2005).

A reepitelização é estimulada pela liberação de citocinas e pela perda das células vizinhas e posteriormente pelo TGF- α e pelo EGF. Fibroblastos também secretam fatores de crescimento de queratinócitos (KGF-1 e KGF-2) e IL-6, os quais estimulam a migração e proliferação e diferenciação dos queratinócitos vizinhos para a lesão (BROUGHTON *et al.*, 2006; SMOLA *et al.*, 1993). Em contrapartida, os queratinócitos liberam IL-1, responsável por estimular os fibroblastos. À medida que são formadas novas células nas bordas da ferida, elas aderem ao tecido de granulação abaixo (RODERO e KHOSROTEHTANI, 2010). Uma representação esquemática do processo de cicatrização até este ponto é apresentado na Figura 1.

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ÁREA DE UMA FERIDA CUTÂNEA NO DESENCADEAMENTO DA CICATRIZAÇÃO



FONTE: Singer e Clark (1999).

A inflamação inicial é endossada pelo tampão de fibrina, neutrófilos, macrófagos e seus fatores de crescimento, o que desencadeia a angiogênese, a reepitelização e a ativação dos fibroblastos. TGF- β : Fator de crescimento transformador- β , FGF: Fator de crescimento de fibroblastos, VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular, PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas, IGF: Fator de crescimento do tipo insulina, KGF: Fator de crescimento de queratinócitos.

A fase proliferativa é marcada pela contração da ferida, pela notável reepitelização e pela formação de tecido de granulação. Durante o remodelamento, há involução do tecido de granulação e apoptose dos miofibroblastos, células endoteliais e macrófagos, cujo papel de digestão de excesso de proteínas da MEC é substituído pela ação enzimática das MMPs (SINGER e CLARK, 1999; RODERO e KHOSROTEHTANI, 2010). As moléculas estruturais da MEC recém-sintetizada, denominada MEC provisória, como fibrina, fibronectina e ácido hialurônico, são gradualmente substituídas por uma matriz composta majoritariamente por colágeno (SINGER e CLARK, 1999). A matriz do tecido de granulação, formada por cerca de 30% de colágeno do tipo III, é substituída por uma mais forte e organizada, composta somente por 10% a 20% de colágeno do tipo III e o restante de colágeno do tipo I, como no tecido não-lesionado (EHRlich e KRUMMEL, 1996). A MEC e os fibroblastos controlam-se mutuamente até que uma matriz estável se forme em um período de meses a anos. O principal evento nessa fase é a deposição

de colágeno em fibras mais grossas, de maneira ordenada, formando uma complexa rede responsável pela elasticidade e resistência da cicatriz e da pele, enquanto que as fibras sempre paralelas à pele do tecido de granulação são reabsorvidas. Contudo, o colágeno da cicatriz nunca se tornará tão organizado quanto o encontrado no tecido íntegro e a elasticidade nunca voltará a ser total (BROUGHTON *et al.*, 2006).

1.2 CICATRIZAÇÃO CRÔNICA

A cicatrização pode ser prejudicada por diversos fatores. Tanto as condições que evitam como as que mantêm a inflamação são igualmente responsáveis. Essas condições incluem a presença de tecido necrótico, infecção ou de agentes citotóxicos no interior da ferida, manipulação inadequada e imunidade comprometida (IRION, 2005). Uma série de doenças também altera a cicatrização normal, tais como diabetes, tumores, hipertensão, hipotireoidismo, problemas renais, hepáticos e respiratórios (BROUGHTON *et al.*, 2006), além de hemofilia e outras doenças relacionadas à alteração na população de plaquetas e formação ineficaz do coágulo (MARTIN, 1997). O bom estado nutricional do paciente, da mesma forma, tem grande importância durante o processo cicatricial, pois a regeneração da pele depende de fatores como sangue e nutrientes (MACKAY e MILLER, 2003).

A dificuldade de cicatrização em indivíduos diabéticos é causada por diversos fatores intrínsecos, como neuropatia, problemas vasculares e complicações sistêmicas da diabetes, e fatores extrínsecos, como infecção e possibilidade de pressão excessiva no local. Tradicionalmente, neuropatia, isquemia e trauma são conhecidas como a tríade patogênica da cicatrização diabética. Entretanto, a tríade patogênica é uma supersimplificação, especialmente por não mencionar especificamente as infecções, que tem papel importante na gênese das feridas diabéticas, sendo causa de hospitalizações e até mesmo amputações (FALANGA, 2005). Pacientes com diabetes tipo 1 apresentam mais doenças macrovasculares do que a população em geral, bem como deficiências microcirculatórias, ocasionadas provavelmente pela necrose celular devido ao dano oxidativo ao ácido desoxirribonucleico (DNA), que incluem redução no tamanho capilar, aumento da espessura da membrana basal (o que pode interferir na migração de leucócitos, contribuindo para o

desenvolvimento de infecções) e hialinose arteriolar. Apesar do lúmen dos vasos não estar reduzido na diabetes, o fluxo sanguíneo é mal distribuído, devido justamente às deficiências na microcirculação sanguínea, em conjunto com a denervação do nervo simpático e neuropatia autonômica. Na neuropatia, a resposta neurovascular, dependente de fibras nervosas nociceptivas tipo C e de fibras C adjacentes está prejudicada, o que leva à deficiência na secreção de substância P e histamina, o que consequentemente interfere na vasodilatação, particularmente em situações de trauma, estresse e pressão. A função endotelial prejudicada pode ainda reduzir os níveis de NOS (FALANGA, 2005).

Apesar de a hipóxia inicial ser benéfica à cicatrização de feridas, uma hipóxia prolongada torna-se prejudicial, em parte por manter por tempo exacerbado eventos desencadeados pela falta de oxigênio, como migração celular, angiogênese e produção de fatores de crescimento, e também por causar formação de radicais livres. As úlceras diabéticas parecem estar estacionadas na fase proliferativa, com inflamação desajustada e deposição de MEC prejudicada. O debridamento realizado por neutrófilos e macrófagos é negativamente afetado na diabetes, bem como o equilíbrio na contração da ferida e o balanço entre deposição, persistência e remodelamento dinâmico das proteínas da MEC. Os macrófagos presentes nessas feridas apresentam alteração na liberação de citocinas como TNF- α , IL-1 e VEGF, além de ativação excessiva de algumas MMPs, como a MMP9, o que pode reduzir a migração celular e levar à ruptura de proteínas de matriz necessárias. Já os fibroblastos isolados de úlceras diabéticas exibem fenótipo senescente, com expressão reduzida de receptores tipo 2 para TGF- β , fosforilação prejudicada de sinais de transdução como mães contra o homólogo decapentalgico 2 e 3 (SMAD 2 e 3) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Essas células apresentam também resposta proliferativa reduzida em contato com fatores de crescimento e exibem sinalização alterada de TGF- β e PDGF, dentre outras citocinas (FALANGA, 2005). Outra condição patológica que influencia negativamente a cicatrização é a imunossupressão. A redução no número de leucócitos, células importantes para o processo inflamatório por realizarem migração tecidual e liberação de mediadores, resulta na inibição da expressão de citocinas e quimiocinas proinflamatórias, bem como na supressão de vias de sinalização envolvidas na imunidade adaptativa e na cicatrização (CAIN e

CIDLOWSKI, 2017). O desfecho dessa situação é a ocorrência de uma inflamação crônica, que carece de um pico inflamatório seguido da apoptose das células do sistema imunológico, e se mantém em um nível baixo por um período exacerbado. Esse processo inflamatório ineficaz é incapaz de estimular a atividade dos fibroblastos e, conseqüentemente, o desencadear a fase proliferativa da cicatrização (FRYKBERG e BANKS, 2015).

Feridas crônicas representam também um problema para a saúde pública mundial. Nos Estados Unidos quase 15% dos beneficiários do Medicare, o serviço público de saúde norte-americano, o que equivale a cerca de 8,2 milhões de pacientes, são acometidos por essa complicação e o custo anual estimado para o seu tratamento é de \$28 bilhões, podendo alcançar de \$31,7 bilhões a \$96,8 bilhões caso sejam incluídas no cálculo as feridas consideradas diagnóstico secundário (NUSSBAUM *et al.*, 2018), usualmente o caso, pois pacientes com feridas crônicas costumam ter comorbidades do tipo cardiovasculares, dermatológicos ou endócrinos (GUEST *et al.*, 2017). No Reino Unido, estima-se que o serviço de saúde National Health Service investiu em um ano £26.7 milhões para assistir feridas e comorbidades associadas (GUEST *et al.*, 2017). Somente no País de Gales, a frequência de feridas crônicas alcança 6% da população e o custo total do atendimento de pacientes com feridas crônicas representa 5,5% do total gasto com saúde no país (PHILLIPS *et al.*, 2015). De forma similar, o sistema de saúde alemão, German Statutory Health, diagnosticou 1,04% dos seus pacientes com complicações advindas da cicatrização (HEYER *et al.*, 2016). Esse cenário pode vir a ser pior no futuro, devido ao aumento anual na prevalência de feridas crônicas nas populações de diferentes países (HEYER *et al.*, 2016; GUEST *et al.*, 2017). Apesar desse conjunto de dados, o investimento financeiro nesta área de pesquisa é proporcionalmente pequeno e poucas drogas são aprovadas com o propósito de melhorar a cicatrização (BASQUERIZO-NOLE *et al.*, 2015; FOX, 2016).

Dessa forma, necessita-se de novos estudos para a busca de um tratamento cicatrizante que origine rapidamente uma pele íntegra e com morfofisiologia normal, formando um produto final esteticamente adequado, marcado o mínimo possível pela cicatriz. Portanto, pode-se dizer que a cicatrização ideal possui fase inflamatória eficaz e rápida, capaz de remover

micro-organismos eficientemente e de estimular adequadamente a formação do tecido de granulação (RODRIGUES *et al.*, 2012).

1.3 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas formaram a base de um sistema sofisticado conhecido como medicina tradicional, existente há milhares de anos, mas que continua a fornecer novos medicamentos à humanidade. É possível que o conhecimento sobre plantas medicinais dentro de cada cultura tenha evoluído através do sistema de tentativa e erro e que as descobertas mais importantes tenham sido transmitidas de forma verbal a cada geração. As pessoas que usavam essa forma de medicina sabiam através do empiricismo que determinadas plantas poderiam ser altamente eficazes se usadas na dose terapêutica. *Catharanthus roseus* representa um exemplo da importância do uso tradicional das plantas. Essa erva, nativa do sudeste de Madagascar, fonte de alcaloides, é usada popularmente com alta taxa de eficácia no tratamento de leucemia e doença de Hodgkin. Contudo, por não haver o conhecimento científico para explicar e prever a ação farmacológica no uso das plantas, por muito tempo em certas culturas, o uso de plantas medicinais ficou associado à bruxaria e superstição (GURIB-FAKIM, 2006). A indústria farmacêutica utiliza esse conhecimento para o desenvolvimento de novos fármacos (CALIXTO, 2005). Como comprovação desse fato, as opções de tratamento de doenças seriam muito escassas caso substâncias ativas provenientes de plantas medicinais, como por exemplo a codeína e a quinina, não tivessem sido isoladas (BUTLER, 2004; NEWMAN *et al.*, 2000). Produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todas as drogas em uso clínico no mundo e incluem os contraceptivos que bloqueiam a ovulação desenvolvidos a partir das espécies do gênero *Dioscorea* sp. e do seu derivado diosgenina, além de reserpina e outros alcaloides anti-hipertensivos e também pilocarpina, para o tratamento de glaucoma e boca seca, oriunda de árvores sul-americanas *Pilocarpus* sp. (GURIB-FAKIM, 2006). A diversidade molecular encontrada na natureza é o principal motivo do interesse da indústria farmacêutica em direcionar seus estudos na busca de substâncias com atividade em alvos biológicos (TURNER, 1998). Apesar de o número de pesquisas para validar a utilização farmacológica de plantas aumentar expressivamente, apenas cerca de 1% das espécies tropicais foram

estudadas. Da flora brasileira, composta por aproximadamente 55.000 espécies, apenas 0,4% delas foi investigada acerca de sua atividade farmacológica (GURIB-FAKIM, 2006). Logo, esse tipo de pesquisa faz-se necessária e deve ser incentivada.

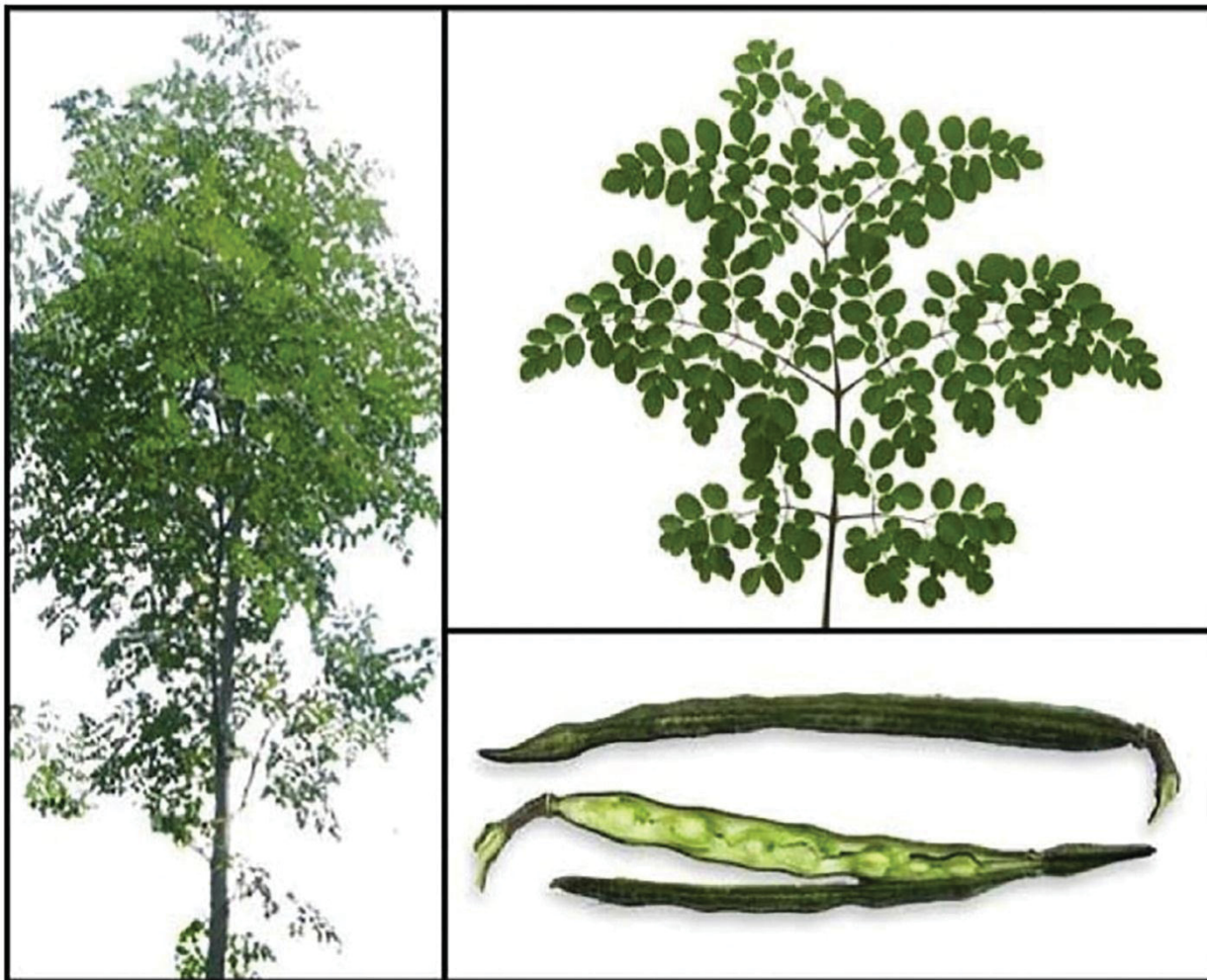
1.4 *Moringa oleifera*

A família Moringaceae compreende um único gênero, que engloba 12 espécies, dentre as quais, *M. peregrina*, *M. stenopetala*, *M. longituba*, *M. concanensis*, *M. ovalifolia* e a mais conhecida: *M. oleifera* (MORTON, 1991). *Moringa oleifera* Lamarck (Lam.) é nativa da região norte da Índia, porém atualmente está amplamente distribuída nas regiões tropicais e até mesmo subtropicais (RAMACHANDRAN *et al.*, 1980). É encontrada em áreas secas e em florestas tropicais úmidas, de até 1000 metros de altitude, ao longo do Oriente Médio, África e Ásia, além de outras áreas, graças à sua adaptabilidade (LEONE *et al.*, 2016). A planta é bastante popular nos países do leste e sudeste asiáticos, mas também é usada na América do Sul, Central e em outros países localizados próximos aos trópicos (XIAO *et al.*, 2020). Esse fato pode ser também explicado devido a *M. oleifera* ser uma das plantas citadas na milenar medicina indiana Ayurveda, que consiste em uma série de diretrizes para se manter o equilíbrio e a harmonia do organismo, e esta ter grande influência sobre a cultura no uso de plantas medicinais na América do Sul e Central (GURIB-FAKIM, 2006). A medicina Ayurveda é considerada a base da medicina atual. Acredita-se que os conceitos de Hipócrates (460-377 a.C.), um dos fundadores da medicina europeia, tiveram raízes em crenças antigas da medicina indiana, cujos conhecimentos eram passados desde 2000 a.C. de geração em geração, até que, em 500 a.C., houve a inclusão da medicina Ayurveda no currículo da Universidade de Banaras e Samhita, uma das enciclopédias que formam a base dessa medicina, foi escrita 700 anos mais tarde, a outra enciclopédia que complementa e conclui as ideias da primeira foi publicada (GURIB-FAKIN, 2006).

M. oleifera é uma árvore perene de porte médio, sua altura varia de 5 a 10 metros, raramente alcançando 15 metros (MORTON, 1991). A propagação da planta se dá por sementes ou estaquia (BHATTACHARYA e MANDAL, 2004). Apresenta raízes tuberosas, com estoque de substâncias de reserva, e tronco

e ramos delgados, com madeira macia e esponjosa. Sua folhagem tem aspecto rendado, sendo as folhas compostas, dispostas alternadamente em espiral. Elas têm de 20 a 50 cm de comprimento total (MORTON, 1991) e cada folíolo tem de 12 a 18 mm de comprimento (Figura 2) (RAMACHANDRAN *et al.*, 1980).

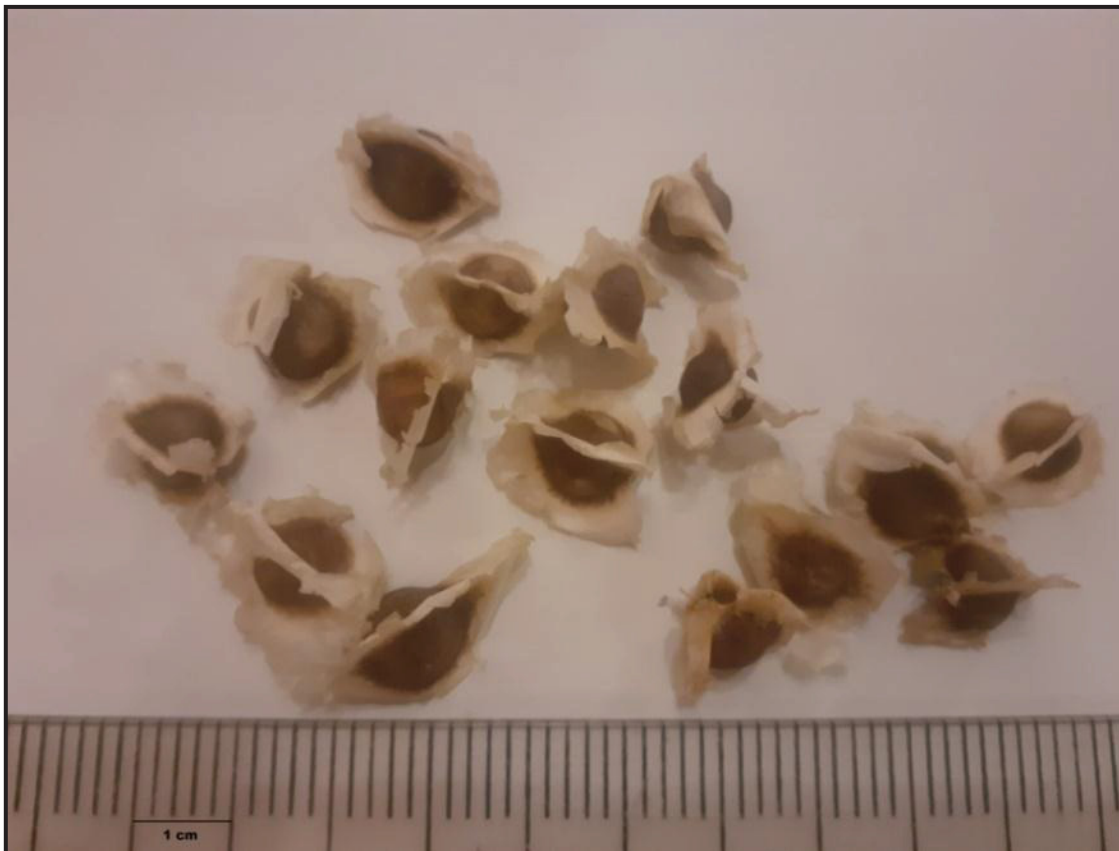
As flores, inflorescências de aspecto piramidal e inclinadas, de 10 a 25 cm de comprimento, agradavelmente perfumadas e de cerca de 2,5 cm de largura, nascem abundantemente nas axilas ou gemas. Apresentam cor branca ou creme, cinco sépalas e cinco pétalas espatuladas, circundando os cinco estames e os cinco estaminódios, estames rudimentares estéreis (MORTON, 1991). Observa-se simetria bilateral e presença de néctar. As flores, cuja abertura se dá pela manhã, favorecem a polinização cruzada devido a uma receptividade retardada do estigma. A polinização bem-sucedida das flores requer um grande número de visitas de insetos. Em populações naturais, em média 10,28% das flores rendem frutos, do tipo vagens (BHATTACHARYA e MANDAL, 2004).

FIGURA 2 - IMAGEM DAS PARTES DA ÁRVORE *Moringa oleifera* LAM.

FONTE: Tiloke *et al.* (1991).

A planta apresenta folhas alternadas e compostas, com pelo menos 20 cm de comprimento. Os frutos do tipo vagens ficam pendentes na árvore e quando abertos evidenciam as sementes aladas em seu interior.

Justamente por causa de seus frutos, com formato alongado e esguio, ela é conhecida popularmente na Índia como *baqueta*, em lembrança ao acessório musical (RAMACHANDRAN e GOPALAKRISHNAN, 1980). Os frutos são cápsulas semelhantes a vagens, verde-claros, muito finos, macios e pendurados. Com o amadurecimento, engrossam gradualmente até 2 cm de largura, tornam-se verde-escuros, firmes e com 25 a 45 cm de comprimento. Apresentam três lados, denominados válvulas, nove nervuras, são marrons e afilados na base e no ápice (MORTON, 1991). Os frutos são indeiscentes, ou seja, não se abrem naturalmente após a maturação, e protegem sementes marrons, arredondadas e tri-aladas (Figura 3) (RAMACHANDRAN *et al.*, 1980).

FIGURA 3 - IMAGEM DAS SEMENTES DE *M. oleifera* LAM.

FONTE: Autoria própria (2021).

Apresentam forma arredondada, tri-aladas, cerca de 1,5 cm de diâmetro, marrons, cerne esbranquiçado e macio.

É conhecida como “árvore milagrosa”, uma vez que tem múltiplos usos, como: recurso para melhorar o estado nutricional, forragem, madeira para construção, lenha, combustível, goma e coagulante para purificação de água (POPOOLA e OBEMBE, 2013). Na Índia, Malásia, Filipinas e África tropical, a árvore é apreciada por seus frutos, folhas, flores, raízes e óleo das sementes, todos comestíveis. As folhas jovens e flores são consumidas em saladas, sopas e molhos, enquanto que as vagens jovens, após serem descascadas, podem ser cozidas e ingeridas. Elas são ainda seccionadas e enlatadas para exportação, sendo comumente vendidas em mercados de produtos orientais em países como Estados Unidos (Figura 4). As sementes maduras extraídas podem ser consumidas fritas ou assadas. O óleo pode ser obtido para uso culinário em geral e para o tempero de saladas. As raízes, uma vez tratadas, podem ser utilizadas para produção de condimento da culinária local (MORTON, 1991).

FIGURA 4 - IMAGEM DOS FRUTOS ENLATADOS E COMERCIALIZADOS DE *Moringa oleifera* LAM.



FONTE: Morton (1991).

Frutos imaturos, seccionados e enlatados na Índia para exportação.

O extrato das sementes de *M. oleifera* é usado mundialmente, especialmente em áreas rurais e em países em desenvolvimento, para o tratamento da água, tornando-a própria para ingestão. As sementes contêm lectinas, que se ligam aos carboidratos, exercendo um efeito coagulante e possibilitando a redução da turbidez da água. Contudo, devem ser usadas com cautela, pois existem indícios de que uma delas, a lectina coagulante de *M. oleifera* (cMoL), apresenta atividade anti-inflamatória e pode ser citotóxica para células (ARAÚJO *et al.*, 2013).

De fato, *M. oleifera* exibe propriedades medicinais, sendo usada popularmente no tratamento da diabetes, na modulação do sistema imunológico e no tratamento de infecções, hipertensão, infertilidade, anemia e malária (POPOOLA e OBEMBE, 2013), além de afecções dermatológicas, gastrointestinais e doenças reumáticas (FAIZAL *et al.*, 2014). Inclusive, acredita-se que tenha sido usada desde o Antigo Egito para finalidade cosmética (FRIGHETT *et al.*, 2007; FAIZAL *et al.*, 2014). Estudos corroboram

sua atividade farmacológica e apontam para efeitos relacionados à modulação do sistema imunológico: de forma primária pela eliminação direta de patógenos ou influenciando no equilíbrio entre mediadores pró e anti-inflamatórios liberados pelas diversas células envolvidas com o sistema imunológico (XIAO *et al.*, 2020). Essas ações podem ser explicadas pela presença de diversos fitoquímicos na sua composição, que lhe conferem um vasto número de aplicações. A maioria das partes da planta, como folhas, sementes, raízes e flores podem ser utilizadas para o tratamento de uma série de enfermidades (FIDRIANNY *et al.*, 2021).

A árvore apresenta uma grande produção de sementes, das quais é possível obter, a baixo custo, um óleo de boa qualidade, líquido à temperatura ambiente e de cor amarelo dourado (NADEEM e IMRAN, 2016; LEONE *et al.*, 2016). O conteúdo de óleo nas sementes varia de 38 a 42%, similar ao que se encontra em sementes como girassol, chia, melancia e limão e superior ao detectado na soja e no algodão, e não é afetado por longos períodos de seca, qualidade ou salinidade do solo, já que a planta não necessita de cuidados especiais de cultivo (NADEEM e IMRAN, 2016).

O óleo das sementes de *M. oleifera* (OSMO) pode ser obtido através de uma variedade de processos industriais, incluindo a extração por solventes e a prensagem a frio, sendo que o método de extração não afeta a densidade, o índice de refração e o de saponificação do óleo. O que difere é que a extração a frio aumenta a viscosidade e a acidez do óleo, se comparadas ao obtido com uso de solvente, indicativas de boa resistência à hidrólise (LEONE *et al.*, 2016). O refinamento, composto pela neutralização, desgomagem e clareamento, não é mandatório para o uso do óleo, mas aumenta a densidade, a viscosidade, o índice de saponificação e o de oxidação. Tanto o óleo cru, como o neutralizado e o desgomado apresentam grande estabilidade primária à oxidação, porém o óleo submetido ao processo completo de refinamento, demonstra ainda melhor estabilidade oxidativa, podendo ser armazenado por mais tempo (SANCHEZ-MACHADO *et al.*, 2015). O óleo apresenta ainda boa estabilidade térmica, frente a mudanças de temperatura (OGUNSINA *et al.*, 2014).

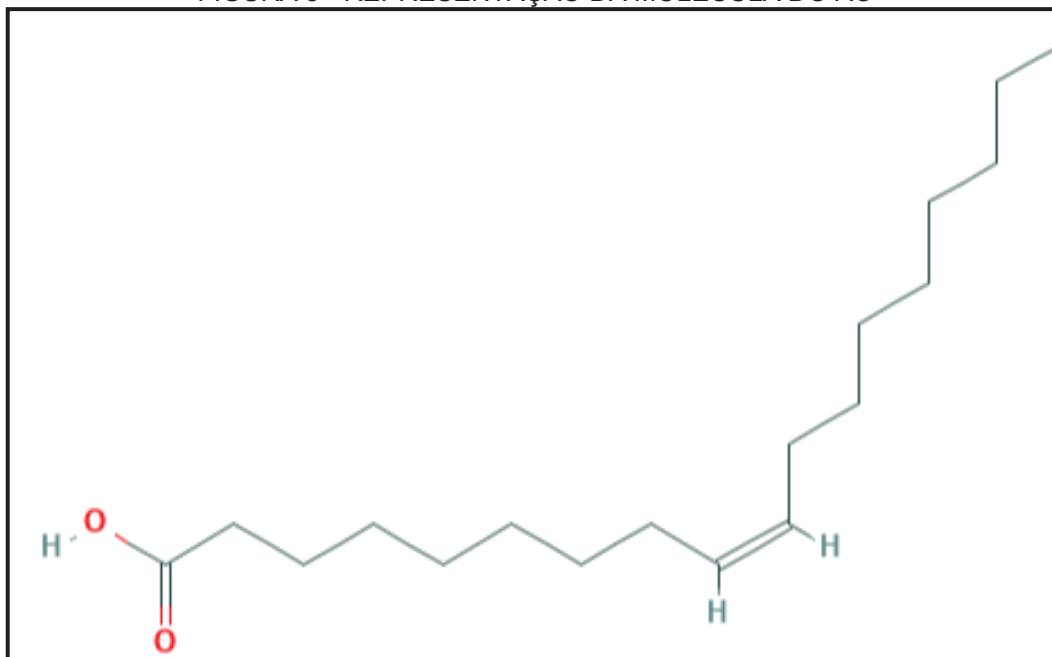
O método de extração e o refinamento, diferentemente das condições agro-climáticas de cultivo, não afeta a composição de ácidos graxos do óleo. O teor de ácidos graxos saturados costuma ser de 21,18%, sendo o ácido palmítico o componente majoritário nesse grupo, seguido pelo ácido behênico, ácido

esteárico e ácido eicosanoico. O teor de ácidos graxos monoinsaturados é em média 76,73%, sendo o ácido oleico (AO) o componente principal, respondendo por 73,5% do total de ácidos graxos no óleo, seguido por ácido gadoleico e palmitoleico. Por fim, o teor de ácidos graxos poliinsaturados se encontra bastante reduzido, em média 1,18%, sendo 0,76% ácido linoleico e 0,46% ácido linolênico. Em comparação a outro óleo rico em ácidos graxos monoinsaturados, o azeite de oliva, o OSMO apresenta um teor reduzido de ácidos graxos poliinsaturados, o que favorece a resistência à umidade e ao oxigênio. Outra diferença em relação aos dois óleos é a composição de esteróis. O OSMO é constituído principalmente, em um total de 92%, de β -sitoesterol, estigmasterol, campesterol e Δ^5 -avenasterol. O OSMO também apresenta alta taxa de tocoferol, principalmente α e γ , o que também contribui para sua estabilidade (LEONE *et al.*, 2016).

O ácido graxo monoinsaturado AO, componente primordial do OSMO, está amplamente presente em diversos outros óleos vegetais, como no óleo de avelã, abacate, amêndoa, canola, amendoim e gergelim (SCHWINGSHACKL e HOFFMANN, 2012), além de ser conhecido como o constituinte de 80% do azeite de oliva (HUTH *et al.*, 2015). Nas plantas nativas brasileiras, o AO também se encontra presente, sendo o composto principal do óleo de açaí, castanha do Pará, pequi e andiroba (MELO *et al.*, 2018).

O AO é um ácido graxo não essencial composto por uma cadeia de 18 carbonos (NADEEM e IMRAN, 2016). A classificação dos ácidos graxos em saturados, monoinsaturados ou poliinsaturados é baseada no número de pontes de hidrogênio na sua composição estrutural. O AO é classificado como monoinsaturado, ou seja, apresenta apenas uma ligação insaturada, dupla, em sua estrutura, no Carbono 9 (C9) (Figura 5)..

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DA MOLÉCULA DO AO



FONTE: PUBCHEM (2021).

Cadeia carbônica composta por 18 C, com uma ligação dupla no C9, contado a partir do radical carboxila.

Por muitos anos, reduziu-se a importância dos ácidos graxos a nutrientes com capacidade de fornecimento de energia e precursores na biossíntese de macromoléculas. Realmente, o consumo de ácidos graxos monoinsaturados é parte importante da nutrição de lipídios no mundo, especialmente na região do Mediterrâneo. Porém, a importância do AO extrapola o âmbito nutricional e está relacionada também à promoção da saúde e ao tratamento de enfermidades nos mais diversos sistemas fisiológicos. O AO apresenta efeitos moduladores nas condições inflamatórias, atua na fibroplasia e melhora a cicatrização de feridas (CARDOSO *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2012). Além disso, por ser um ácido graxo monoinsaturado, o AO pode atuar como componente estrutural na síntese de fosfolipídios de membrana, contribuindo para a sinalização celular, transdução e proliferação, mas não como precursor primário de mediadores lipídicos inflamatórios como os metabólitos do ácido araquidônico (AA), que, em conjunto com citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, são relevantes na inflamação desencadeada com a lesão tecidual (CARDOSO *et al.*, 2011).

Sendo assim, é possível que o OSMO atue sobre a cicatrização e que esse efeito seja devido ao AO. Essa hipótese foi elaborada baseando-se no fato de que outras partes da planta se mostraram benéficas para a cicatrização, atuando de forma favorável sobre a inflamação e a deposição de colágeno,

enquanto o óleo das sementes, também um modulador da inflamação, carece de estudos em modelos de cicatrização e quantificação de colágeno. Acredita-se que por ter AO em sua composição, esse efeito seja especialmente positivo, uma vez que esse ácido graxo é conhecido por ser cicatrizante devido a sua atividade promotora de uma fase inflamatória rápida e eficiente e de um adequado desencadeamento da fibroplasia. Dessa forma, OSMO apresenta potencial como tratamento na cicatrização, em particular de feridas crônicas, e no reestabelecimento da fibroplasia apropriada.

2. JUSTIFICATIVA

Dados científicos apontam que as folhas, frutos, flores e sementes da *Moringa oleifera* possuem compostos que regulam a inflamação (ARULSELVAN *et al.*, 2016; CHEENPRACHA *et al.*, 2010; MAHAJAN e MEHTA, 2010) e aprimoram a proliferação e migração de fibroblastos (FERNANDES *et al.*, 2016; GOTHAI *et al.*, 2016). Essas são propriedades fundamentais para o correto desencadeamento da cicatrização. Inclusive, o uso das folhas da *Moringa* para melhorar a cicatrização já foi validado (RATHRIT *et al.*, 2006). Já o quimicamente estável e abundante óleo das sementes dessa planta, apesar de ser usado popularmente com finalidade emoliente e em distúrbios cutâneos, jamais foi objeto de pesquisa no campo da cicatrização, carecendo de estudos a respeito de sua atividade sobre o fechamento de feridas e deposição de colágeno. Seu potencial cicatrizante é grande, uma vez que possui propriedades anti-inflamatórias (CRETELLA *et al.*, 2020) e apresenta como componente mais abundante o ácido graxo AO, descrito como promotor da cicatrização. Há evidências de que o AO aceleraria a fase inflamatória da cicatrização, especialmente em úlceras crônicas, por impulsionar uma inflamação robusta com rápida resolução, seguido da indução de citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento importantes para a fibroplasia (RODRIGUES *et al.*, 2012). Sendo assim, torna-se relevante a validação do uso cutâneo do OSMO e a investigação da importância de seu componente majoritário AO para o efeito cicatrizante do óleo, tanto na cicatrização fisiológica como, particularmente em feridas crônicas, um fardo para o sistema de saúde e a causa da redução na qualidade de vida e risco para os afetados.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a influência do OSMO e do seu componente majoritário AO sobre a duração e o reparo da lesão de pele por excisão em camundongos saudáveis, imunossuprimidos e diabéticos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a influência sobre a taxa de fechamento da lesão do tratamento continuado com OSMO e AO por via tópica em modelo de cicatrização de pele por excisão em camundongos saudáveis, imunossuprimidos e diabéticos;
- Averiguar a influência do OSMO e do AO na qualidade da cicatrização através dos níveis de hidroxiprolina, indicativo indireto de colágeno, e da densidade do colágeno nas cicatrizes de camundongos saudáveis, imunossuprimidos e diabéticos;
- Analisar por meio de técnica imunohistoquímica a presença das células contráteis miofibroblastos durante a fase proliferativa da cicatrização em camundongos saudáveis, imunossuprimidos e diabéticos tratados com OSMO e AO;
- Quantificar por técnica histológica a celularidade na fase inflamatória da cicatrização de camundongos saudáveis, imunossuprimidos e diabéticos submetidos ao tratamento com OSMO e AO.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AQUISIÇÃO DE OSMO E AO

O OSMO foi produzido e distribuído comercialmente no Paraguai em março de 2016 (Cooperativa Bellanatura, Assunção, Paraguai, latitude 25°18'59.2" E, longitude 57°33'53.4" W). A produção ocorreu a partir de sementes selecionadas, descascadas e prensadas a frio, sem o uso de

aditivos. Nos experimentos OSMO foi utilizado puro, sem diluição, aplicado diretamente na área da ferida, uma vez que esta é a dose e a via de administração usada popularmente. A análise de cromatografia gasosa e espectrometria de massa constatou que o AO é o constituinte principal do óleo das sementes, correspondendo a 72,27% da composição (CRETELLA *et al.*, 2020).

O AO adquirido (Cayman Chemical Company, Ann Harbor, EUA) foi diluído no veículo óleo mineral (RaiaDrogasil S.A., São Paulo, Brasil) de acordo com a sua porcentagem na composição do OSMO, de modo que seu efeito isolado pudesse ser comparado ao efeito total do OSMO, composto pelo AO e outros constituintes. O óleo mineral foi usado como veículo em um grupo controle e seus resultados foram utilizados para comparação com os demonstrados no grupo AO.

4.2 ANIMAIS

Camundongos Swiss fêmeas (8-10 semanas de idade, 20–25 g) foram fornecidos pela Universidade Federal do Paraná e mantidos sob condições laboratoriais padrão, em gaiolas de fundo sólido de polipropileno com cama de cepilho autoclavado. Comida e água foram disponibilizadas *ad libitum*, em um ciclo de claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00 h). A temperatura do ambiente foi mantida controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), assim como a umidade local ($60 \pm 10\%$). Os animais foram divididos de forma aleatória em grupos experimentais. A todos os animais foi permitida a aclimação por pelo menos 1 dia antes dos experimentos e cada animal foi utilizado na experimentação apenas uma vez. Todos os protocolos foram conduzidos de acordo com as diretrizes ARRIVE (KILKENNY *et al.*, 2010) e aprovados pelo Comitê de Ética para uso Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO) sob o número 1121.

4.3 IMUNOSSUPRESSÃO INDUZIDA POR DEXAMETASONA EM CAMUNDONGOS

Para o estabelecimento da imunossupressão, 1 mg/Kg de dexametasona (A Química Santa Marina S.A., Rio de Janeiro, Brasil) foi injetada via i.m. uma

vez por dia nos camundongos, enquanto os animais do grupo controle receberam pela mesma via de administração solução salina (DIEHL *et al.*, 2017). O tratamento começou 17 dias antes do procedimento de excisão cutânea e foi mantido até o fechamento das feridas. Para validação do protocolo experimental, ao final do período de tratamento, amostras de sangue foram coletadas por via intracardíaca em animais anestesiados com cetamina e xilazina (i.p., 100 e 10 mg/Kg, respectivamente) para contagem automatizada de leucócitos e linfócitos (Mindray BC-2800 Vet, Mindray, Shenzhen, China). Ademais, animais foram eutanasiados e órgãos do sistema imunológico como timo, baço e linfonodos inguinais, além das glândulas adrenais, foram pesados como indicação adicional de imunossupressão.

4.4 DIABETES INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA EM CAMUNDONGOS

Diabetes foi induzida através da injeção i.p. uma vez ao dia por 3 dias de 80 mg/Kg de estreptozotocina (STZ, Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) em solução tampão de citrato (10 mM, pH 4,5) recém preparada. Antes da injeção, os camundongos foram mantidos em jejum por 2 h (adaptado de FURMAN, 2015). Após três meses da finalização do tratamento com STZ, a indução de *diabetes mellitus* foi confirmada com a avaliação da glicemia em jejum. Para tal, foi coletado sangue da veia caudal após pequeno corte na ponta da cauda. Animais com glicemia igual ou acima de 250 mg/dL foram considerados diabéticos e incluídos no estudo.

4.5 MODELO DE EXCISÃO CUTÂNEA

Camundongos saudáveis, imunossuprimidos e diabéticos, com o pelo removido, foram anestesiados com cetamina e xilazina (i.p., 100 e 10 mg/Kg, respectivamente) e tiveram uma excisão cutânea de 6 mm de diâmetro criada na região dorsal com o uso de um *punch* de biópsia estéril. Após a excisão, as feridas foram tratadas por via tópica com 20 µl de OSMO, 20 µl de AO 70% (diluído no veículo de óleo mineral conforme a porcentagem de sua presença no OSMO), 20 µl de óleo mineral (veículo do AO) ou 20 µl de Dersani® (Saniplan, Rio de Janeiro, Brasil) (Figura 6). O Dersani® é composto por ácido

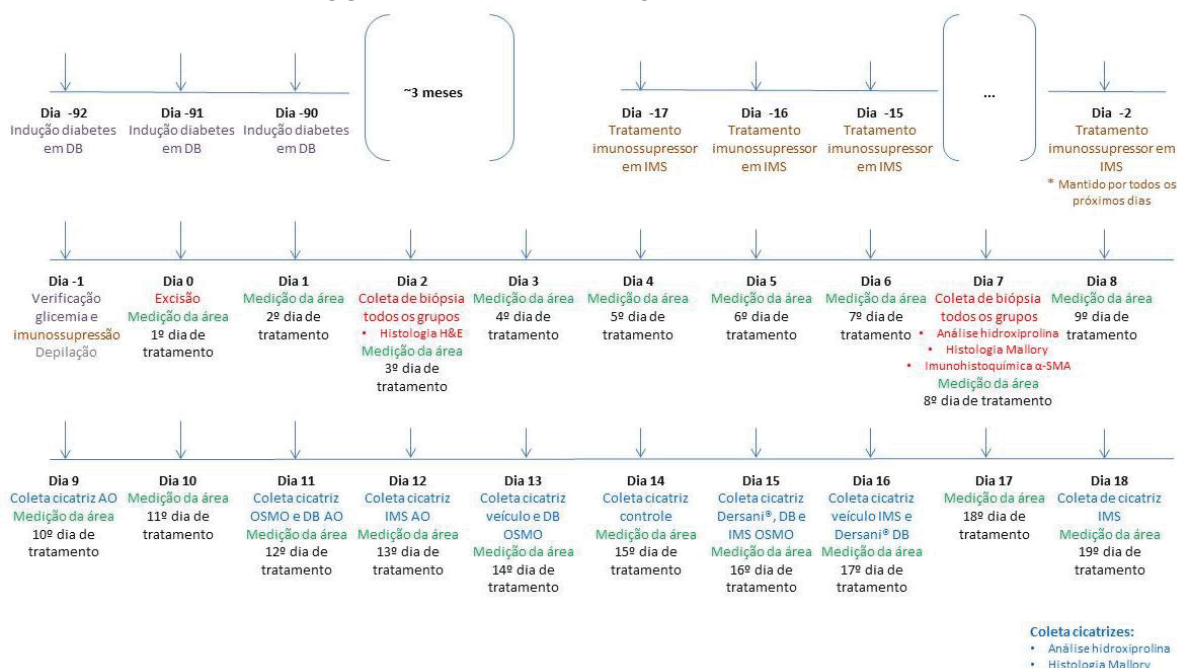
caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, lecitina de soja, vitamina A, vitamina E, ácido capróico e óleo de girassol (constituído principalmente por ácido linoleico), utilizado neste estudo como controle positivo por estar comercialmente disponível para finalidade cicatrizante. Todos os tratamentos foram mantidos em frequência diária até o fechamento das feridas (Figura 7). Durante esse período, os camundongos foram acondicionados em gaiolas individuais e tiveram livre acesso à água e ração. O diâmetro das feridas foi medido diariamente em uma folha transparente por um pesquisador em análise cega e as imagens obtidas foram transformadas em valores numéricos com o software Image J versão 1.48 (National Institute of Health, EUA). As feridas de cada animal mensuradas no dia 0 tiveram suas áreas consideradas como 100% e as porcentagens das áreas das feridas nos dias posteriores foram relativas a esse valor. A redução da área da ferida se mostrou indicativa da taxa de cicatrização e a determinação do fechamento ocorreu quando estas apresentaram área média correspondente a no máximo 5% da área inicial. No segundo e no sétimo dia após a excisão ou quando as feridas foram consideradas fechadas, os animais foram eutanasiados e as amostras do tecido cicatricial foram coletadas e submetidas às análises posteriores.

FIGURA 6 - ESQUEMA DE TRATAMENTOS UTILIZADO NO ESTUDO

Grupo controle sem tratamento pré-excisão	Tratamento imunossupressor Dexametasona i.m. 1 mg/Kg	Tratamento indutor de diabetes Streptozotocina i.p. 80 mg/Kg
Feridas tratadas via tópica com 20 µL OSMO	Feridas tratadas via tópica com 20 µL OSMO	Feridas tratadas via tópica com 20 µL OSMO
Feridas tratadas via tópica com 20 µL AO 70%	Feridas tratadas via tópica com 20 µL AO 70%	Feridas tratadas via tópica com 20 µL AO 70%
Feridas tratadas via tópica com 20 µL óleo mineral (veículo para AO)	Feridas tratadas via tópica com 20 µL óleo mineral (veículo para AO)	Feridas tratadas via tópica com 20 µL óleo mineral (veículo para AO)
Feridas tratadas via tópica com 20 µL Dersani® (tratamento comercial)	Feridas tratadas via tópica com 20 µL Dersani® (tratamento comercial)	Feridas tratadas via tópica com 20 µL Dersani® (tratamento comercial)
Feridas não tratadas por via tópica	Feridas não tratadas por via tópica	Feridas não tratadas por via tópica

Camundongos foram tratados segundo a descrição. As colunas referem-se aos tratamentos sistêmicos para indução ou não de cronicidade nas feridas, enquanto cada linha traz o tratamento tópico utilizado em conjunto. OSMO: óleo das sementes de *Moringa oleifera*; AO: ácido oleico.

FIGURA 7 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



Sequência linear de ações executadas durante o estudo. OSMO: óleo das sementes de *Moringa oleifera*; AO: ácido oleico; IMS: imunossuprimidos; DB: diabéticos; H&E: hematoxilina e eosina; α-SMA: α-actina de musculatura lisa.

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TECIDUAL DE HIDROXIPROLINA (HYP)

A quantificação da proteína hidroxiprolina permite a determinação indireta do conteúdo de colágeno no tecido, por ser um aminoácido presente exclusivamente nessa proteína. Até a execução do protocolo, as amostras das cicatrizes, devidamente homogeneizadas em solução salina 0,9%, foram congeladas a -70°C imediatamente após a coleta. Para a determinação da concentração da HYP, as amostras congeladas foram, então, liofilizadas e submetidas à hidrólise, em 2 mol/L de hidróxido de sódio (NaOH). Uma alíquota de 50 mL do hidrolisado foi destinada à oxidação com o reagente oxidante de Cloramina T e, por fim, foram adicionados 500 mL de Reagente de Ehrlich, que forma um complexo com a HYP presente na amostra, gerando uma reação colorimétrica. A intensidade da coloração é proporcional à quantidade do aminoácido presente na amostra, comparado a uma curva padrão de HYP (REDDY e ENWEMEKA, 1996). A leitura da absorbância foi feita em 550 nm em leitor de placa de ELISA.

4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras de tecido contendo as cicatrizes foram coletadas em períodos diferentes do processo de cicatrização e fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) por imersão durante 16 horas, sendo em seguida conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação, quando as amostras foram submetidas às soluções de crescentes concentrações alcoólicas. Posteriormente, os tecidos foram emblocados em parafina, seccionados em cortes de 5 µm em um micrótomo e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), no caso dos retirados no segundo dia após a excisão, ou tricrômio de Mallory, no caso dos retirados no sétimo dia após a excisão ou quando as feridas fecharam. Enquanto a combinação H&E possibilita a quantificação da celularidade por a Hematoxilina corar de azul o núcleo celular e a Eosina corar de rosa as proteínas citoplasmáticas, o Tricrômio de Mallory usa a Fucsina Ácida para a coloração nuclear, Orange G para a coloração citoplasmática e Azul de Anilina para a marcação de fibrilas de colágeno, o que resulta em um método apropriado para a visualização de tecido conectivo. Os cortes contendo os tecidos foram fotografados à magnificação 100X com o uso de uma câmera digital acoplada ao microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). As imagens foram analisadas através do software Image J software versão 1.48 (National Institute of Health, EUA). O valor da quantificação celular total apresentado para cada animal é representado pelos valores de ao menos cinco áreas diferentes de três cortes histológicos e as medidas da determinação do colágeno foram representadas pela quantidade de pixels azuis nas imagens de pelo menos três cortes histológicos de cada animal.

4.8 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

O tecido resultante do processo de cicatrização sete dias após a excisão foi fixado, desidratado e emblocado em parafina conforme descrito na seção *Análise histológica*. Os cortes de 5 µm obtidos com o uso do micrômetro foram dispostos sobre lâminas histológicas gelatinizadas, submetidos à desparafinização com xileno e álcoois e à hidratação subsequente em banhos

sucessivos em soluções com decrescentes concentrações alcoólicas. Os radicais aldeído foram bloqueados pela glicina 0,1 M, enquanto a peroxidase endógena e sítios não específicos foram bloqueados com H₂O₂ 3% em metanol ou (tampão fosfato salino/albumina de soro bovino) PBS/BSA 1%, respectivamente. As amostras foram, então, incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo anti- α actina de músculo liso (α -SMA, coelho, 1:50, Abcam, Cambridge, Inglaterra) em câmara úmida, posteriormente lavadas com PBS e novamente incubadas com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (HRP-conjugated anti-rabbit, 1:50, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) por 1 hora a temperatura ambiente em câmara úmida. As lâminas foram lavadas mais uma vez com PBS e expostas ao kit cromógeno ap por 15 minutos. Por fim, elas foram banhadas em PBS, contracoradas com Hematoxilina, desidratadas em sucessivos banhos de etanol em concentrações progressivamente maiores e montadas. O valor da quantificação de células positivamente marcadas pela imunohistologia apresentado para cada animal é representado pelos valores de ao menos cinco áreas diferentes de três cortes histológicos.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados com o uso do software Prisma versão 6.0 (GraphPad, San Diego, EUA) e expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas através do teste T de Student ou da análise de variância ANOVA de uma via seguida do pós teste Bonferroni. Os valores $p < 0,05$ foram considerados significativos.

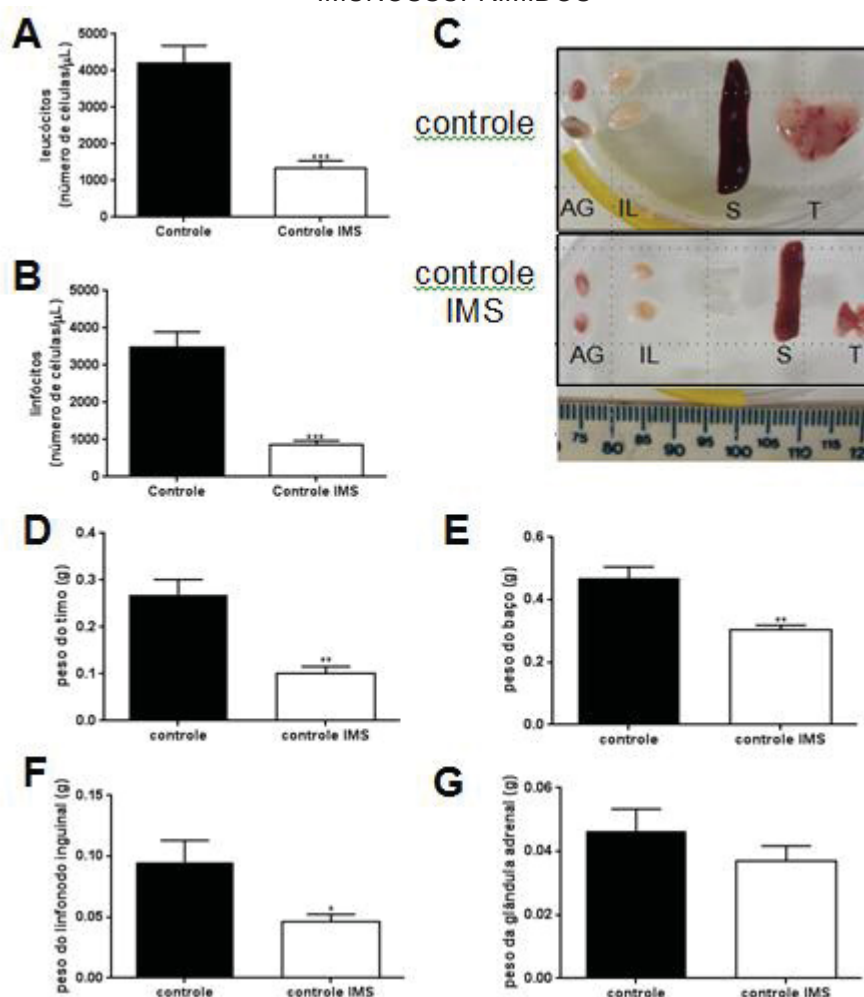
5. RESULTADOS

5.1 CONFIRMAÇÃO DA IMUNOSSUPRESSÃO INDUZIDA POR DEXAMETASONA

Observou-se que os camundongos submetidos ao tratamento com a dexametasona apresentaram um decréscimo significativo de $68,1 \pm 15\%$ e $75,1 \pm 12,9\%$ na quantificação de leucócitos e linfócitos, respectivamente (Figura 8A e B). Além disso, houve redução do peso do timo ($62,3 \pm 5,3\%$), baço ($35,3 \pm$

3%) e dos linfonodos inguinais ($51,2 \pm 6,2\%$) em relação aos não tratados (Figura 8D, E e F). Não foram detectadas, porém, mudanças no tamanho e peso das glândulas adrenais (Figura 8C e G).

FIGURA 8 - PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DOS CAMUNDONGOS IMUNOSSUPRIMIDOS



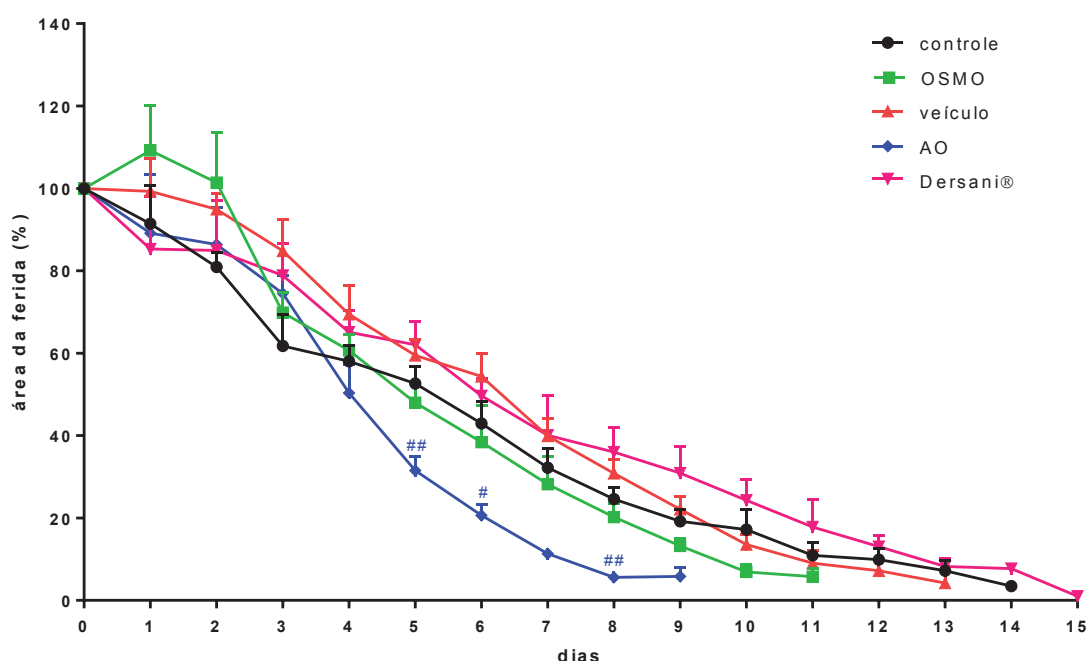
A-B. O sangue dos camundongos anestesiados foi coletado após 17 dias de tratamento diário com dexametasona (i.m.) ou solução salina (i.m.) e submetido a análise de hemograma para contagem de leucócitos e linfócitos, respectivamente. **C-G.** Subsequente ao tratamento diário por 17 dias com dexametasona (i.m.) ou solução salina (i.m.), os animais foram eutanasiados e o timo, o baço, os linfonodos inguinais e as glândulas adrenais foram coletados, fotografados e pesados. Na análise estatística, foi utilizado o teste T de Student. As barras representam médias \pm EPM. * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle não imunossuprimido, ** $p < 0.01$ comparado ao grupo controle não imunossuprimido; *** $p < 0.001$ comparado ao grupo controle não imunossuprimido ($n = 4-5$). Controle: grupo controle não imunossuprimido, controle IMS: grupo tratado com dexametasona. AG: glândula adrenal, IL: linfonodo inguinal, S: baço, T: timo.

5.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM OSMO E AO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Para averiguar o efeito do tratamento tópico com OSMO e AO no tempo de cicatrização das feridas, camundongos foram submetidos à excisão cutânea

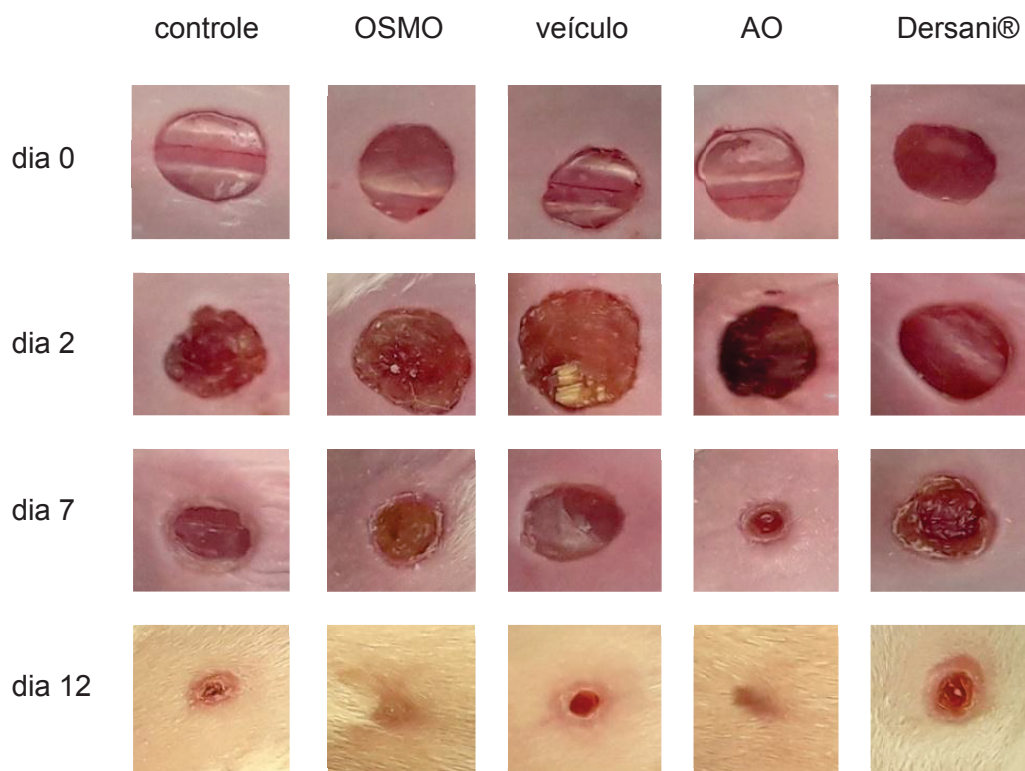
dorsal e posteriormente tratados diariamente de acordo com o seu grupo experimental. Como pode ser verificado na Figura 9, o grupo controle, não tratado, teve suas feridas fechadas 14 dias após o procedimento de excisão, enquanto as feridas tratadas com OSMO fecharam no 11º dia, apresentando uma melhora temporal no processo de cicatrização. A aplicação do veículo óleo mineral ocasionou o fechamento no 13º dia, ao passo que as feridas tratadas com o AO fecharam ao 9º dia (Figura 9). O grupo Dersani® apresentou feridas fechadas apenas ao 15º dia (Figura 9). A oclusão mais rápida das feridas tratadas com o AO é corroborada pelas áreas significativamente menores observadas nos dias 5, 6 e 8, se comparadas ao grupo veículo, como pode ser averiguado na Figura 9. A área calculada sob a curva do grupo controle foi de 560,7 e a sob a curva do grupo veículo foi de 637,1, enquanto os valores para os grupos OSMO e AO foram de 549 e 422,4, respectivamente. O grupo Dersani® apresentou área sob sua curva de 654,4. imagens representativas do efeito de OSMO e AO sobre o fechamento das excisões cutâneas durante o decorrer do processo de cicatrização podem ser observadas na Figura 10.

FIGURA 9 - EFEITO DO OSMO E AO NA TAXA DE FECHAMENTO DA EXCIÇÃO CUTÂNEA



Animais anestesiados foram submetidos à excisão de pele no dia 0 e foram tratados por via tópica diariamente de acordo com seus grupos experimentais (n=3-6). Os pontos representam a área média de ferida no grupo em cada dia ao longo do processo comparada à área inicial. ANOVA de uma via e o post hoc Bonferroni foram utilizados na análise estatística a cada dia. #p<0,05 comparado ao grupo veículo; ###p<0,01 comparado ao grupo veículo óleo mineral. Controle: grupo controle, não recebeu tratamento algum; MOSO: grupo tratado com o óleo de sementes de *Moringa oleifera*; veículo: grupo tratado com óleo mineral, veículo oleoso em que o AO foi diluído; AO: Grupo tratado com ácido oleico 70% diluído em óleo mineral; Dersani®: grupo tratado com óleo cicatrizante comercial, controle positivo.

FIGURA 10 - IMAGENS REPRESENTATIVAS DO EFEITO DO OSMO E AO NA TAXA DE FECHAMENTO DA EXCISÃO CUTÂNEA

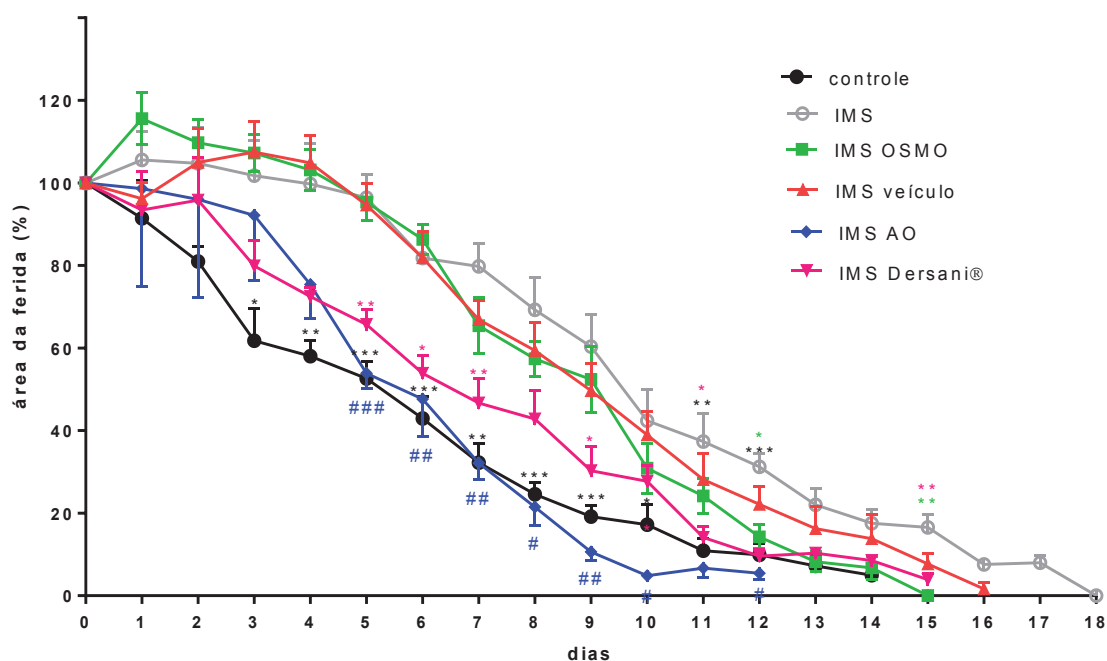


As feridas dos animais sob tratamento foram fotografadas nos dias 0, 2, 7 e 12. Controle: grupo controle, não recebeu tratamento algum; MOSO: grupo tratado com o óleo de sementes de *Moringa oleifera*; veículo: grupo tratado com óleo mineral, veículo oleoso em que o AO foi diluído; AO: Grupo tratado com ácido oleico 70% diluído em óleo mineral; Dersani®: grupo tratado com óleo cicatrizante comercial, controle positivo.

As figuras 11 e 12 revelam o curso da cicatrização de animais imunossuprimidos submetidos à excisão cutânea e ao esquema de tratamento previamente apresentado. Contrastando com o tempo de cicatrização dos camundongos saudáveis do grupo controle, o período de cicatrização dos camundongos imunossuprimidos se estendeu até 18º dia (Figura 11). O atraso na oclusão das feridas dos indivíduos imunossuprimidos foi atestado com a determinação do tamanho diário das feridas entre os dias 3 e 12, quando essas lesões estavam significativamente maiores do que as do controle saudável (Figura 11). A área calculada sob a curva do grupo controle foi de 561,4, enquanto a sob a curva do grupo controle imunossuprimido foi de 1032. A aplicação tópica de OSMO nas feridas dos indivíduos imunossuprimidos acarretou em fechamento no 15º dia, similar ao tempo de fechamento observado nas feridas do grupo tratado com Dersani® (Figura 11). Nos dias 12 e 15 após a excisão, OSMO efetivamente apresentou feridas significativamente menores do que as exibidas pelos animais do grupo controle imunossuprimido.

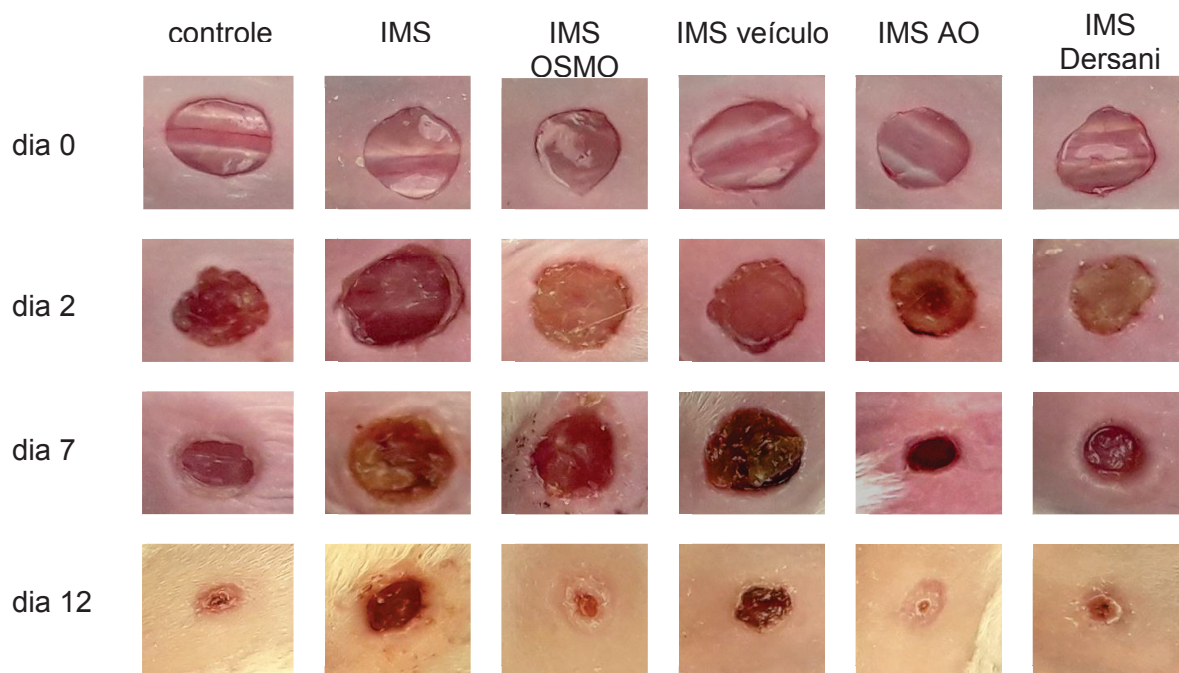
Os valores de área sob a curva para os grupos OSMO e Dersani® foram de 926,8 e 703,2 respectivamente. Novamente, o tratamento com AO melhorou o tempo de cicatrização se comparado com o veículo, ocluindo as feridas apenas 12 dias após o procedimento de excisão (Figura 11). Quando as feridas dos indivíduos imunossuprimidos tratados com AO foram consideradas fechadas, as do grupo imunossuprimido tratado com veículo ainda estavam com $22.1 \pm 4.3\%$ do seu tamanho original (Figura 11). De fato, como se nota nas Figuras 11 e 12, exceto no 11º dia, em todos os outros momentos examinados a partir do 5º dia após a excisão até o término da contração da ferida, os camundongos imunossuprimidos tratados com AO mostraram feridas significativamente menores do que os camundongos imunossuprimidos tratados com veículo. O grupo tratado com AO apresentou área sob sua curva de 592 e o tratado com o veículo, 943,8. Do mesmo modo, Dersani® exibiu feridas reduzidas do 5º ao 7º dia e no 9º, no 11º e no 15º dias, se comparadas ao controle imunossuprimido (Figura 11). As imagens representativas dos efeitos desencadeados pelos tratamentos no transcorrer da cicatrização dos indivíduos imunossuprimidos podem ser observadas na Figura 12.

FIGURA 11 - EFEITO DO OSMO E OA SOBRE A CICATRIZAÇÃO
IMUNOSSUPRIMIDA



Animais anestesiados foram submetidos à excisão cutânea no dia 0 e foram tratados por via tópica diariamente de acordo com seus grupos (n=3-6). A. Os pontos representam a área média de ferida no grupo em cada dia ao longo do processo comparada à área inicial. ANOVA de uma via e o *post hoc* Bonferroni foram utilizados na análise estatística a cada dia. #p<0,05 comparado ao grupo veículo; ##p<0,01 comparado ao grupo veículo óleo mineral; ###p<0,001 comparado ao grupo veículo; *p<0,01 comparado ao grupo IMS; ** p<0,01 comparado ao grupo IMS; ***p<0,001 comparado ao grupo IMS. IMS: grupo controle imunossuprimido, recebeu tratamento de dexametasona, mas não recebeu tratamento tópico algum; grupo IMS OSMO: grupo tratado com dexametasona sistemicamente e tratado topicamente com o óleo de sementes de *Moringa oleifera*; grupo IMS veículo: grupo tratado com dexametasona sistemicamente e tratado topicamente com óleo mineral, veículo oleoso em que o AO foi diluído; grupo IMS AO: grupo tratado com dexametasona sistemicamente e tratado topicamente com AO 70% diluído em óleo mineral; grupo IMS Dersani®: grupo tratado com dexametasona sistemicamente e tratado topicamente com óleo cicatrizante comercial.

FIGURA 12 - IMAGENS REPRESENTATIVAS DO EFEITO DO OSMO E OA SOBRE A CICATRIZAÇÃO IMUNOSSUPRIMIDA

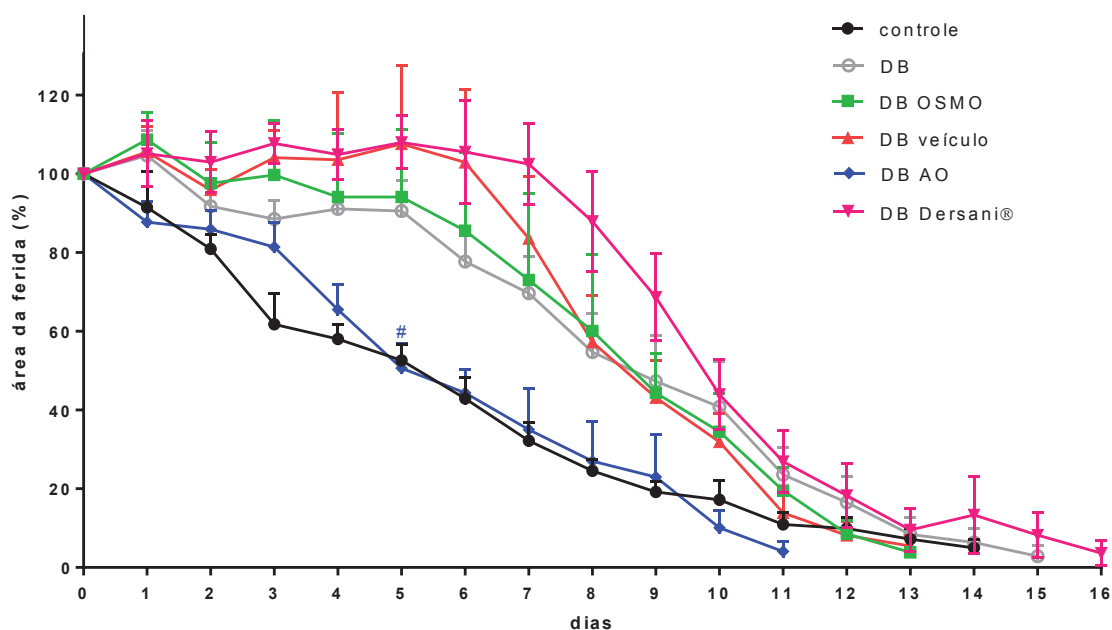


As feridas dos camundongos sob tratamento foram fotografadas nos dias 0, 2, 7 e 12. IMS: grupo controle imunossuprimido, recebeu tratamento de dexametasona, mas não recebeu tratamento tópico algum; grupo IMS OSMO: grupo tratado com dexametasona sistemicamente e tratado topicamente com o óleo de sementes de *Moringa oleifera*; grupo IMS veículo: grupo tratado com dexametasona sistemicamente e tratado topicamente com óleo mineral, veículo oleoso em que o AO foi diluído; grupo IMS AO: grupo tratado com dexametasona sistemicamente e tratado topicamente com AO 70% diluído em óleo mineral; grupo IMS Dersani®: grupo tratado com dexametasona sistemicamente e tratado topicamente com óleo cicatrizante comercial.

Nas figuras 13 e 14, pode-se avaliar a taxa de cicatrização e o tempo necessário para o devido término do processo em animais diabéticos submetidos à excisão cutânea e ao esquema de tratamento previamente apresentado. Observa-se que os camundongos diabéticos revelaram oclusão da ferida no 15º dia posterior à excisão, apenas um dia após o fechamento das feridas dos animais do grupo controle não diabético (Figura 13). A área calculada sob a curva do grupo controle foi de 561,4, enquanto a sob a curva do grupo controle diabético foi de 863,2. O tratamento das feridas diabéticas com OSMO reduziu esse tempo de fechamento para 13 dias. O uso isolado do veículo também ocasionou o fechamento no 13º dia. Mais uma vez a aplicação de AO antecipou o processo de cicatrização para 11 dias. Na verdade, no 5º dia, as feridas diabéticas tratadas com AO eram $52,9 \pm 12,4\%$ menores que as feridas diabéticas tratadas com veículo (Figura 13). A área sob a curva para os grupos OSMO e AO foram de 872 e 562,7, respectivamente. O grupo veículo

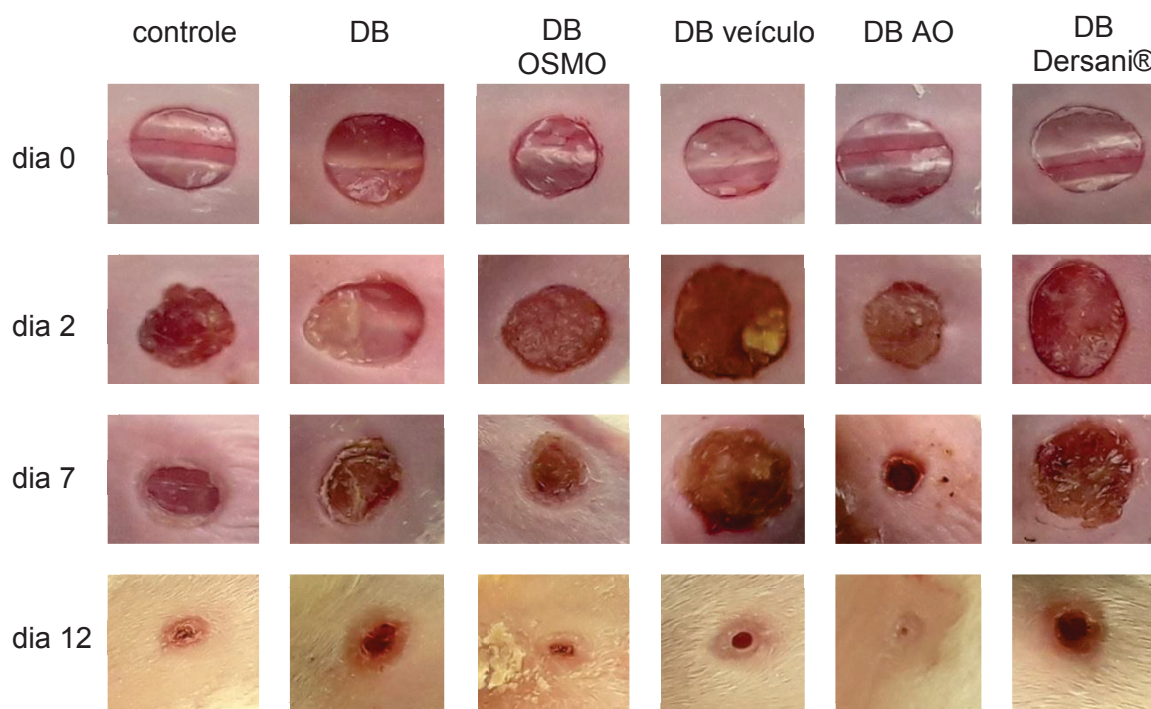
apresentou área de 910,5 sob sua curva. Curiosamente, as feridas diabéticas tratadas com Dersani® apresentaram fechamento somente no 16º dia após a excisão (Figura 13) e a área calculada sob sua curva foi de 1066. Imagens representativas dos efeitos desencadeados pelos tratamentos no transcorrer da cicatrização diabética podem ser observadas na Figura 14.

FIGURA 13 - EFEITO DO OSMO E OA SOBRE A CICATRIZAÇÃO DIABÉTICA



Animais anestesiados foram submetidos à excisão cutânea no dia 0 e foram tratados por via tópica diariamente de acordo com seus grupos (n=4-6). Os pontos representam a área média de ferida no grupo em cada dia ao longo do processo comparada à área inicial. ANOVA de uma via e o *post hoc* Bonferroni foram utilizados na análise estatística a cada dia. # $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo. Controle: grupo controle não diabético, não recebeu tratamento com STZ ou tratamento tópico nas feridas; DB: grupo controle diabético, recebeu tratamento com STZ, mas não recebeu tratamento tópico nas feridas; DB OSMO: animais tratados com STZ e com o óleo de sementes de *Moringa oleifera*; DB veículo: animais tratados com STZ e com o veículo óleo mineral, no qual o AO foi diluído; DB AO: animais tratados com STZ e com AO 70% diluído em óleo mineral; DB Dersani®: animais tratados com STZ e com Dersani®, óleo cicatrizante comercial.

FIGURA 14 - IMAGENS REPRESENTATIVAS DO EFEITO DO OSMO E OA SOBRE A CICATRIZAÇÃO DIABÉTICA



As feridas dos camundongos em tratamento foram fotografadas nos dias 0, 2, 7 e 12. Controle: grupo controle não diabético, não recebeu tratamento com STZ ou tratamento tópico nas feridas; DB: grupo controle diabético, recebeu tratamento com STZ, mas não recebeu tratamento tópico nas feridas; DB OSMO: animais tratados com STZ e com o óleo de sementes de *Moringa oleifera*; DB veículo: animais tratados com STZ e com o veículo óleo mineral, no qual o AO foi diluído; DB AO: animais tratados com STZ e com AO 70% diluído em óleo mineral; DB Dersani®: animais tratados com STZ e com Dersani®, óleo cicatrizante comercial.

5.3 EFEITO DO OSMO E DO AO NO CONTEÚDO DE HYP

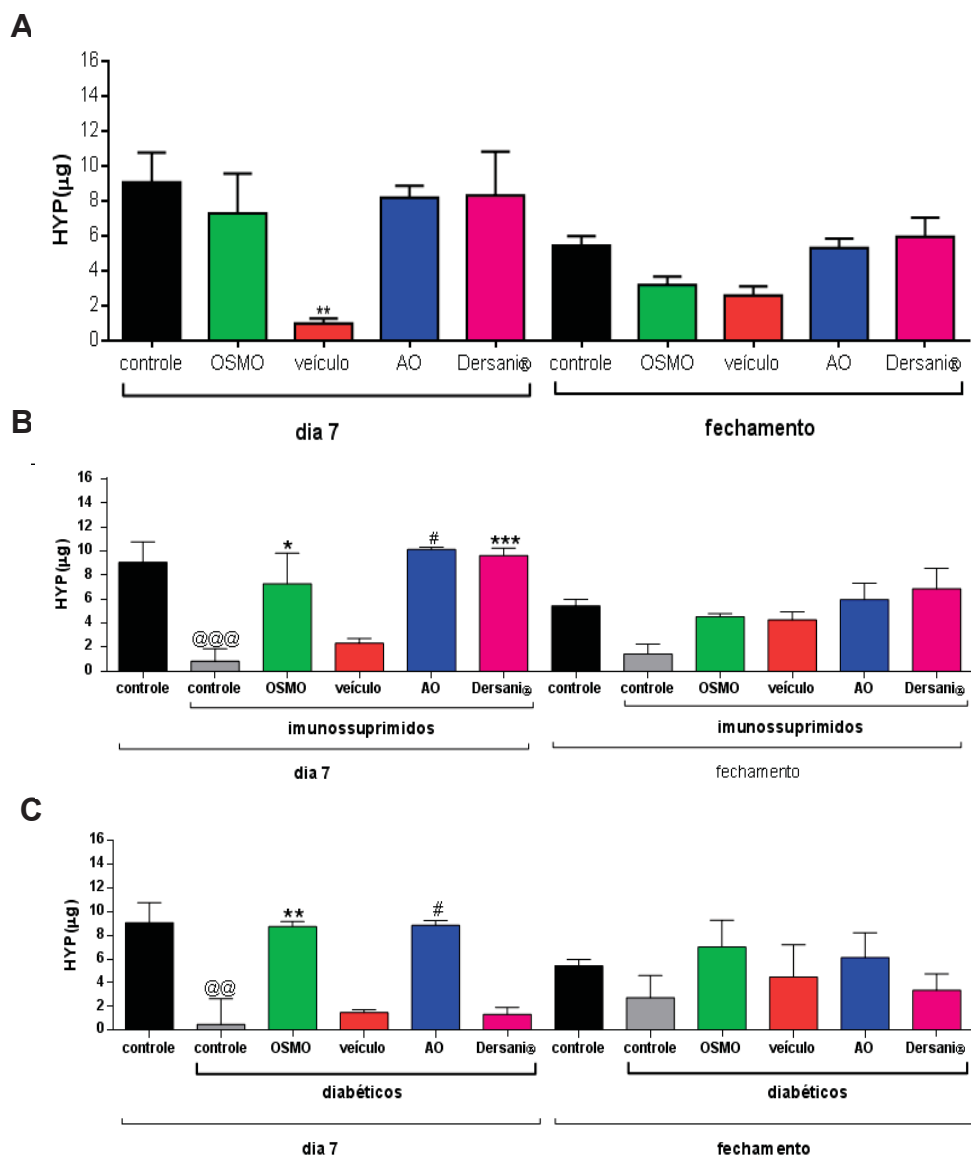
Considerando a HYP um marcador indireto da presença de colágeno, o efeito do tratamento com OSMO e AO sobre os níveis alcançados desse aminoácido foi avaliado em duas etapas da cicatrização: na fase proliferativa, ao 7º dia após a excisão, e quando as feridas fecharam, na etapa de remodelamento do tecido cicatricial. A Figura 16 apresenta, portanto, os dados acerca do conteúdo de HYP decorrente de cada tratamento utilizado durante o processo de cicatrização. Quando monitorado em camundongos saudáveis, no dia 7 após o procedimento de excisão, tanto o grupo controle, como OSMO e o controle positivo Dersani® apresentaram níveis similares de HYP (Figura 15 A). O veículo óleo mineral, porém, reduziu em $89,3 \pm 0,3\%$ o conteúdo de HYP nas feridas saudáveis, se comparado ao grupo controle (Figura 15 A). Contudo, o tratamento com AO não alterou significativamente o conteúdo de HYP quando comparado ao veículo (Figura 15 A). Quanto ao tecido da cicatriz, com as

feridas já fechadas, pode-se observar na Figura 15 A que os níveis de HYP foram similares em todos os grupos, ou seja, nenhum tratamento causou alteração significativa.

A respeito da quantificação da HYP nas feridas crônicas ocasionadas pela depleção do sistema imune, no dia 7 os camundongos imunossuprimidos apresentaram feridas contendo $91,0 \pm 1,7\%$ menos HYP do que as dos animais saudáveis (Figura 15 B). No mesmo dia, as feridas dos camundongos imunossuprimidos tratados com OSMO exibiram $7,27 \pm 2,5 \mu\text{g}$ de HYP, enquanto os camundongos imunossuprimidos do grupo controle apresentaram somente $0,81 \pm 2,1 \mu\text{g}$ (Figura 15 B). Os camundongos imunossuprimidos tratados com veículo não mostraram alterações significativas no conteúdo de HYP em comparação ao grupo controle imunossuprimido, diferentemente dos animais imunossuprimidos tratados com Dersani® (Figura 15 B). O tratamento com AO também aumentou significativamente, em três vezes, os níveis de HYP, se comparado ao veículo, em animais imunossuprimidos (Figura 15 B). Já nas feridas fechadas, nenhuma alteração significativa no conteúdo de HYP decorreu pela ação dos tratamentos (Figura 15 B).

A Figura 16 C ilustra a quantificação da HYP no processo de cicatrização de feridas diabéticas. No 7º dia após a excisão, as feridas diabéticas exibiram $94,4 \pm 23,7\%$ menos HYP do que as lesões dos animais não diabéticos (Figura 15 C). O grupo diabético tratado com OSMO apresentou $8,7 \pm 0,4 \mu\text{g}$ de HYP, maior quantidade em relação ao grupo controle diabético, que apresentava apenas $0,5 \pm 2,1 \mu\text{g}$ (Figura 15 C). As feridas diabéticas tratadas com o veículo óleo mineral apresentaram quantidade similar deste aminoácido em relação ao controle diabético, enquanto o AO causou aumento de cinco vezes nesse valor (Figura 15 C). Pode-se notar, ainda, na Figura 15 C, que o Dersani® não produziu mudança significativa nos níveis de HYP se comparado ao controle diabético. Da mesma forma, nenhuma mudança significativa quanto ao conteúdo de HYP foi detectada no tecido da cicatriz de grupo algum.

FIGURA 15 - INFLUENCIA DO OSMO E DO AO NOS NÍVEIS DE HIDROXIPROLINA (HYP)



No 7º dia após a excisão e quando as feridas fecharam, os animais submetidos aos tratamentos foram eutanasiados e as amostras de suas feridas foram submetidas a ensaio de HYP (n=3-6). Barras representam médias \pm E.P.M de conteúdo de HYP. ANOVA de uma via e *post hoc* Bonferroni foram utilizados na análise estatística. **A.** Conteúdo de HYP em camundongos saudáveis. **p<0,01 comparado ao grupo controle; Controle: grupo controle não tratado; OSMO: grupo tratado com o óleo de sementes de *Moringa oleifera*; veículo: grupo tratado com óleo mineral, veículo usado para diluir o AO; AO: ácido oleico 70% diluído em óleo mineral; Dersani®: grupo tratado com óleo cicatrizante comercial. **B.** Conteúdo de HYP dos animais imunossuprimidos; @@@p<0,001 comparado ao grupo controle; *p<0,05 comparado ao grupo controle imunossuprimido; ***p<0,001 comparado ao grupo controle imunossuprimido; #p<0,05 comparado ao grupo veículo imunossuprimido óleo. Controle: grupo não tratado; controle imunossuprimido: grupo tratado com dexametasona; OSMO: imunossuprimidos tratados topicamente com óleo das sementes de *M. oleifera*; veículo: imunossuprimidos tratados topicamente com veículo óleo mineral; AO: imunossuprimidos tratados com AO diluído a 70% em veículo de óleo mineral; Dersani®: imunossuprimidos tratados topicamente com Dersani®. **C.** Conteúdo de HYP em camundongos diabéticos. @@p<0,01 comparado ao grupo controle; **p<0,01 comparado ao grupo controle diabético; # p<0,05 comparado ao grupo controle diabético tratado com veículo. Controle: grupo não tratado; controle diabético: grupo tratado com STZ; OSMO: diabéticos tratados com óleo das sementes de *M. oleifera*; veículo: diabéticos tratados com veículo óleo mineral; AO: diabéticos tratados topicamente com AO 70% diluído em óleo mineral; Dersani®: diabéticos tratados topicamente com Dersani®.

5.4 EFEITO DE OSMO E AO SOBRE O CONTEÚDO DE COLÁGENO ANALISADO POR HISTOLOGIA

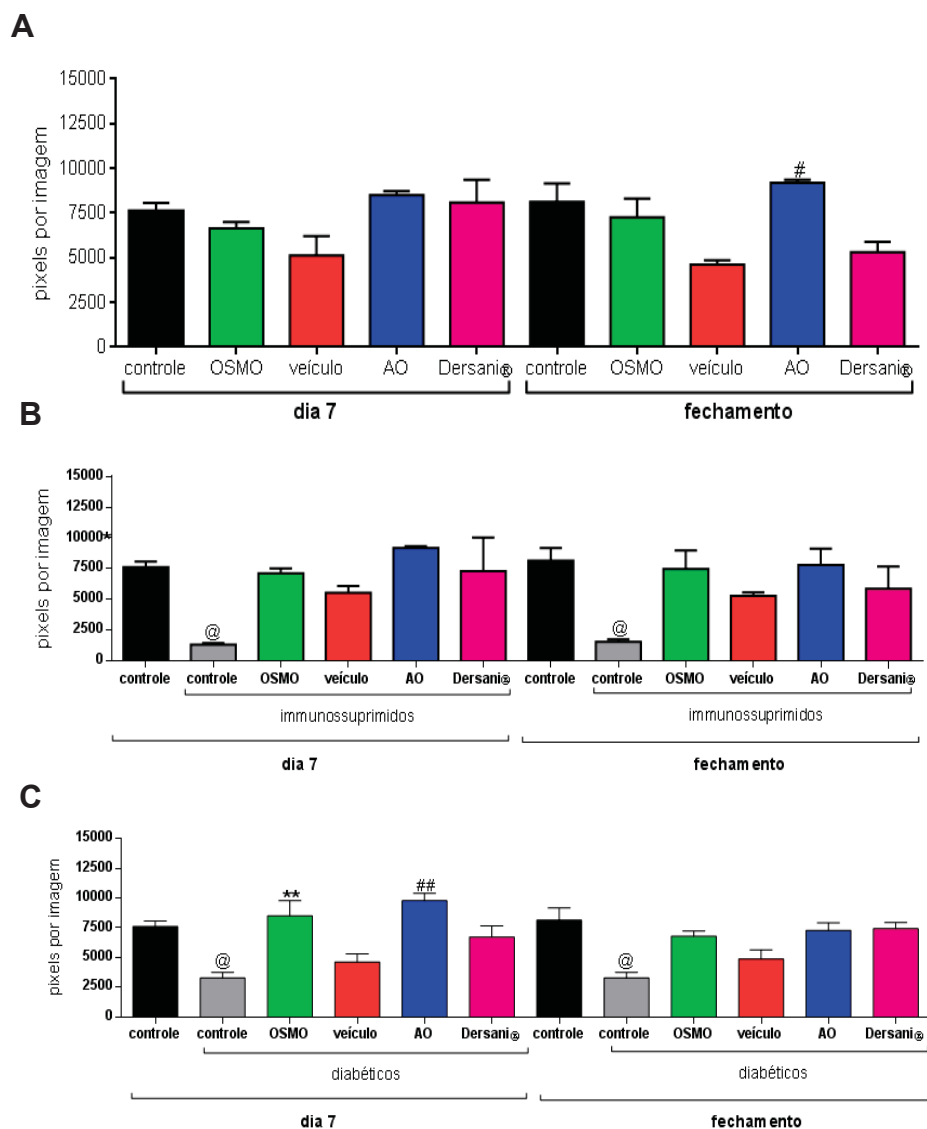
Em reforço ao observado nos ensaios de quantificação indireta de colágeno, nas Figuras 16, 17 e 18 mostram-se os resultados da avaliação histológica de colágeno por coloração com tricrômio de Mallory provocado pelos tratamentos em duas etapas da cicatrização: na fase proliferativa, ao 7º dia após a excisão, e quando as feridas fecharam, na etapa de remodelamento da cicatriz. Examinando os resultados obtidos no 7º dia após a excisão, pode-se notar que o tratamento com o OSMO, veículo, AO ou Dersani® não modificaram quantidade regular de colágeno na ferida, apresentada pelo grupo controle. Mas no tecido cicatricial, quando houve a oclusão da ferida, constatou-se que, enquanto o OSMO, o veículo, e o Dersani® não causaram alterações, a aplicação do AO aumentou em $98,9 \pm 3,5\%$ a quantidade de colágeno, em comparação ao veículo (Figura 16 A e 17).

Na Figura 16 B, observa-se que a imunossupressão reduziu em $82,7 \pm 1,5\%$ a presença de colágeno em relação aos camundongos saudáveis na fase proliferativa, dia 7 após a excisão. Um resultado similar foi observado na fase de remodelamento, quando houve uma redução de $81,2 \pm 2,6\%$ de colágeno na cicatriz dos camundongos imunossuprimidos em relação aos do grupo controle saudável (Figura 16 B). Contudo, nenhum tratamento foi capaz de alterar significativamente o conteúdo de colágeno na ferida em fase proliferativa e na cicatriz dos animais imunossuprimidos (Figura 16 B e 18).

A Figura 16 C expõe que na fase proliferativa as excisões diabéticas apresentaram $57,0 \pm 6,1\%$ menos colágeno do que as submetidas ao processo regular de cicatrização, do grupo controle. As feridas diabéticas tratadas com OSMO, por sua vez, tiveram um aumento na quantidade de colágeno de quase três vezes o conteúdo apresentado nas lesões diabéticas não tratadas (Figura 16 C). O tratamento com o veículo não alterou este parâmetro, em relação ao controle diabético, entretanto o tratamento com AO induziu aumento de colágeno na proporção de duas vezes o apresentado nas feridas diabéticas não tratadas (Figura 16 C). Por fim, o Dersani® não causou mudança significativa no dia 7, quando comparado aos grupos controle (Figura 16 C e 19). A avaliação da presença de colágeno no tecido cicatricial dos camundongos diabéticos, quando houve o fechamento das feridas, revelou que

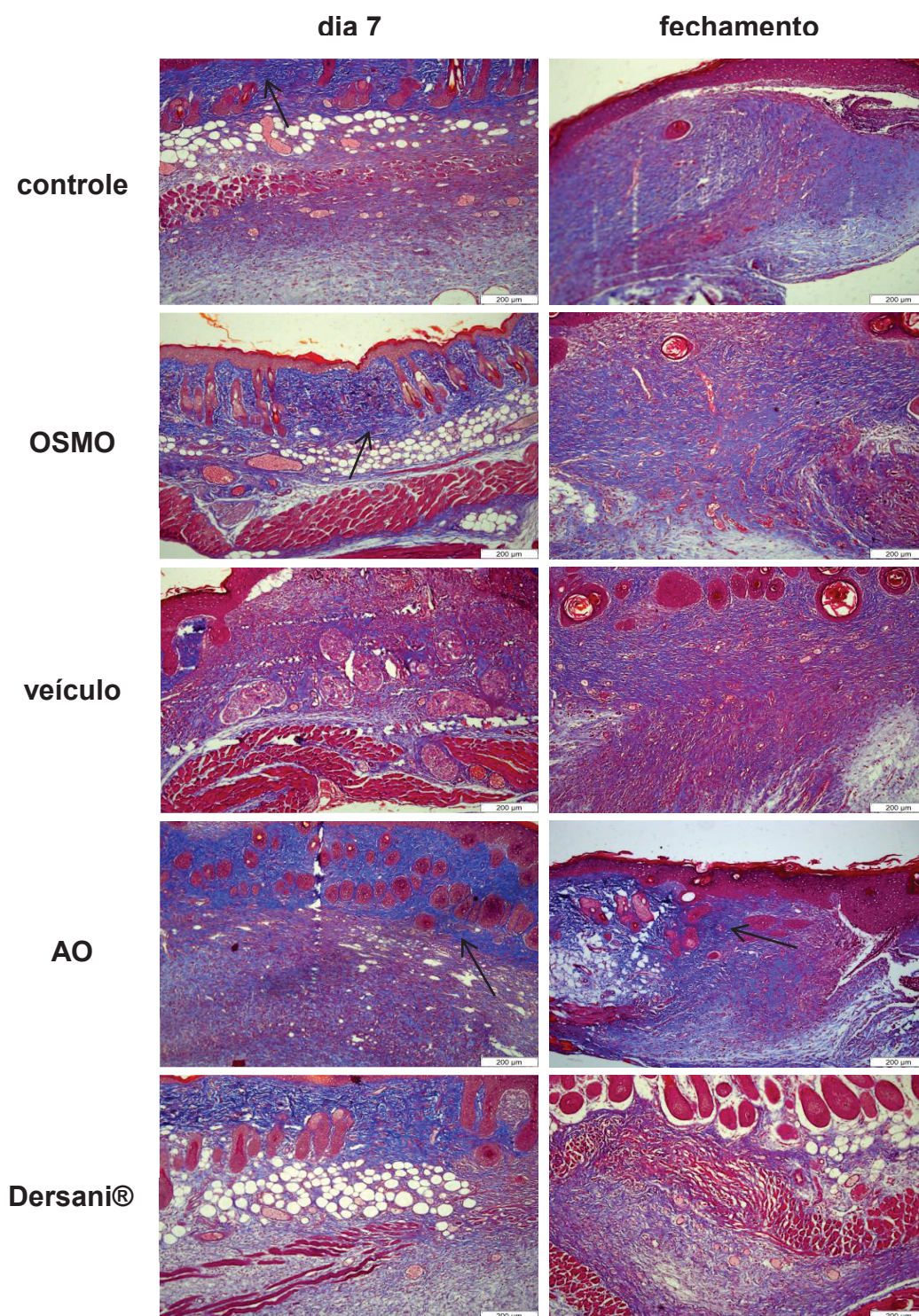
as cicatrizes oriundas da cicatrização diabética apresentavam $59,8 \pm 5,8\%$ menos colágeno do que as oriundas do processo fisiológico de cicatrização (Figura 16 C). No entanto, nenhum dos tratamentos foi capaz de alterar significativamente a quantidade de colágeno nesta fase do processo (Figura 16 C e 19).

FIGURA 16 - EFEITO DE OSMO E AO NA QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO



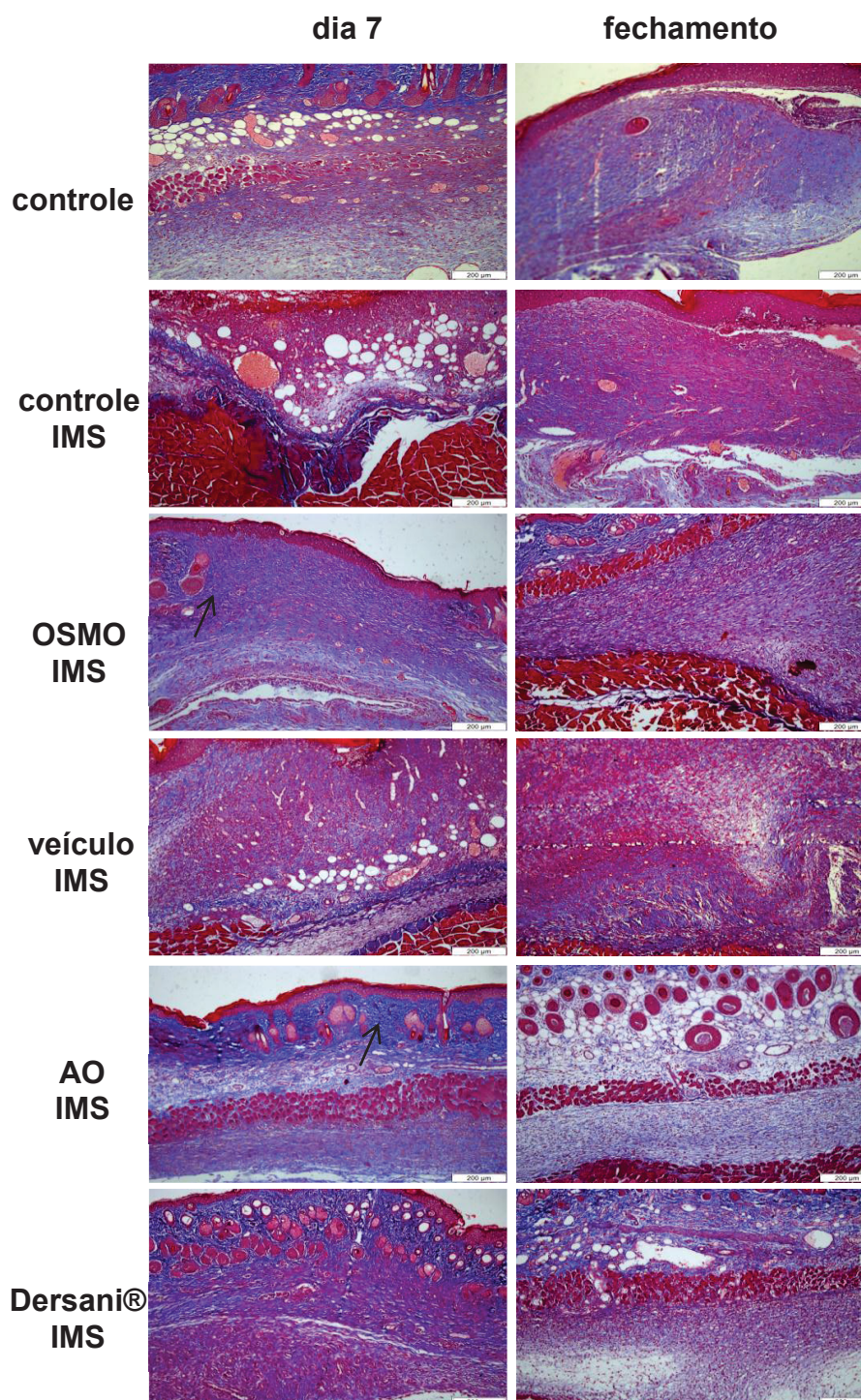
Amostras foram coletadas das feridas no 7º dia após a excisão ou do tecido cicatricial após o fechamento da ferida de animais controle, imunossuprimidos e diabéticos tratados por via tópica seguindo as drogas indicadas. As amostras foram submetidas à análise histológica com coloração tricrômio de Mallory para avaliação do conteúdo de colágeno total. Barras representam médias \pm EPM de *pixels* azuis por imagem de pelo menos três diferentes animais em cada grupo. O software Image J foi utilizado para processar as imagens e ANOVA de uma via e *post hoc* Bonferroni foram utilizados na análise estatística. **A.** Análise da presença de colágeno dos animais saudáveis. [#] $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo. Controle: grupo controle não tratado; OSMO: grupo tratado com o óleo de sementes de *Moringa oleifera*; veículo: grupo tratado com óleo mineral, veículo usado para diluir o AO; AO: ácido oleico 70% diluído em óleo mineral; Dersani®: grupo tratado com óleo cicatrizante comercial. **B.** Análise da presença de colágeno nos animais imunossuprimidos. [@] $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, animais saudáveis. Controle: grupo não tratado; controle imunossuprimido: grupo tratado com dexametasona; OSMO: imunossuprimidos tratados topicamente com óleo das sementes de *M. oleifera*; veículo: imunossuprimidos tratados topicamente com veículo óleo mineral; AO: imunossuprimidos tratados com AO diluído a 70% em veículo de óleo mineral; Dersani®: imunossuprimidos tratados topicamente com Dersani®. **C.** Análise da presença de colágeno em animais diabéticos. [@] $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, animais saudáveis. ^{**} $p < 0,01$ comparado ao grupo controle diabético. Controle: grupo não tratado; controle diabético: grupo tratado com STZ; OSMO: diabéticos tratados com óleo das sementes de *M. oleifera*; veículo: diabéticos tratados com veículo óleo mineral; AO: diabéticos tratados topicamente com AO 70% diluído em óleo mineral; Dersani®: diabéticos tratados topicamente com Dersani®.

FIGURA 17 - IMAGENS REPRESENTATIVAS DO EFEITO DO OSMO E AO NA QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO ORIUNDO DA CICATRIZAÇÃO AGUDA



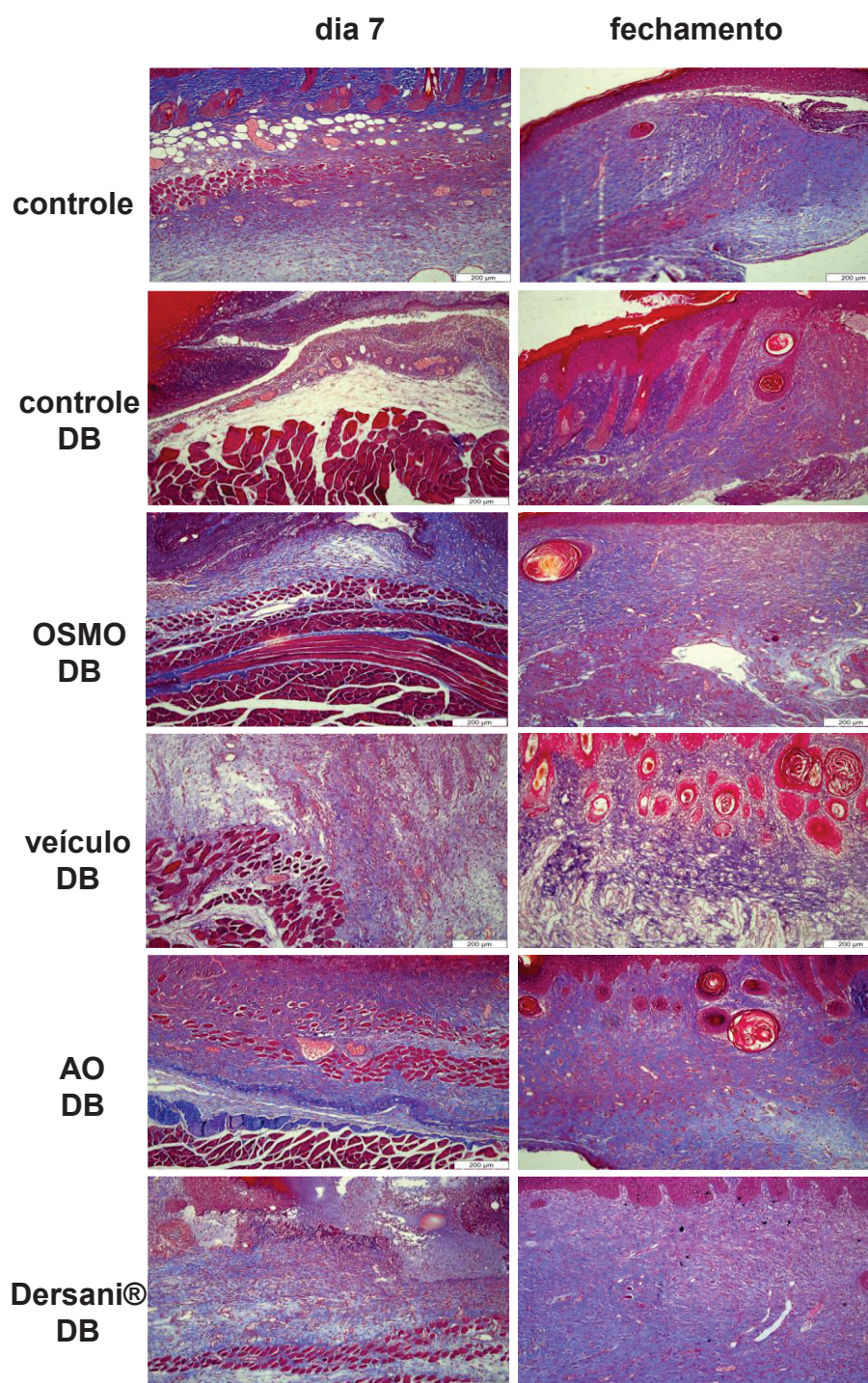
Amostras foram coletadas das feridas no 7º dia após a excisão ou do tecido cicatricial após o fechamento da ferida em animais controle tratados por via tópica segundo as drogas indicadas. As amostras foram submetidas à análise histológica com coloração tricrômio de Mallory para avaliação do conteúdo de colágeno total. Os cortes corados das feridas foram fotografados com magnificação de 100x. A intensidade de azul foi relacionada ao conteúdo de colágeno. As setas pretas apontam o local das fibras de colágeno pela intensidade do azul. Controle: animal não tratado; OSMO: camundongo tratado com o óleo das sementes de *M. oleifera*; veículo: animal tratado com óleo mineral; AO: camundongo tratado com ácido oleico; Dersani®: animal tratado com óleo comercial.

FIGURA 18 - IMAGENS REPRESENTATIVAS DO EFEITO DO OSMO E AO NA QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO ORIUNDO DA CICATRIZAÇÃO IMUNOSSUPRIMIDA



Amostras foram coletadas das feridas no 7º dia após a excisão ou do tecido cicatricial após o fechamento da ferida em animais imunossuprimidos tratados por via tópica segundo as drogas indicadas. As amostras foram submetidas à análise histológica com coloração tricrômio de Mallory para avaliação do conteúdo de colágeno total. Os cortes corados das feridas foram fotografados com magnificação de 100x. A intensidade de azul foi relacionada ao conteúdo de colágeno. As setas pretas apontam o local das fibras de colágeno pela intensidade do azul. Controle: animal não tratado; controle IMS: animal imunossuprimido; OSMO IMS: animal imunossuprimido tratado topicamente com o óleo das sementes de *M. oleifera*; veículo IMS: animal imunossuprimido tratado topicamente com veículoóleo mineral; AO IMS: camundongo imunossuprimido tratado topicamente com ácido oleico; Dersani® IMS: animal imunossuprimido tratado topicamente com óleo cicatrizante comercial.

FIGURA 19 - IMAGENS REPRESENTATIVAS DO EFEITO DO OSMO E AO NA QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO ORIUNDO DA CICATRIZAÇÃO DIABÉTICA



Amostras foram coletadas das feridas no 7º dia após a excisão ou do tecido cicatricial após o fechamento da ferida em animais diabéticos tratados por via tópica segundo as drogas indicadas. As amostras foram submetidas à análise histológica com coloração tricrômio de Mallory para avaliação do conteúdo de colágeno total. Os cortes corados das feridas foram fotografados com magnificação de 100x. A intensidade de azul foi relacionada ao conteúdo de colágeno. As setas pretas apontam o local das fibras de colágeno pela intensidade do azul. Controle: animal não tratado; controle DB: animal diabético; OSMO DB: camundongo diabético tratado topicamente com o óleo das sementes de *M. oleifera*; veículo DB: animal diabético tratado com veículo; AO DB: camundongo diabético tratado topicamente com AO; Dersani® DB: animal diabético tratado topicamente com óleo cicatrizante comercial.

5.5 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM OSMO E AO SOBRE CÉLULAS α -SMA POSITIVAS

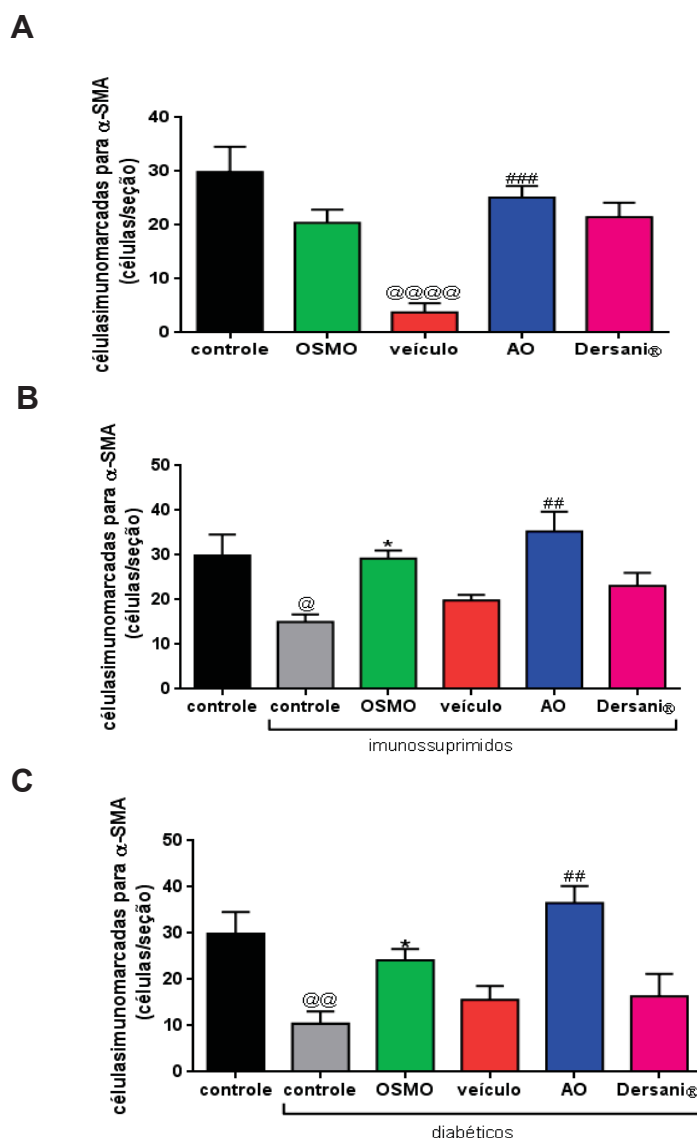
Células α -SMA positivas correspondem aos miofibroblastos da ferida, responsáveis pela sua contração durante a fase de proliferação da cicatrização. As figuras 20 e 21 exibem os resultados observados a partir da imunomarcagem das células positivas para α -SMA. Na Figura 20 A, a partir da quantificação dessa marcação, detectou-se que o OSMO não causou alteração significativa no número de células α -SMA positivas quando comparado ao grupo controle. Já as amostras da ferida do grupo tratado com veículo mostraram $87,3 \pm 13,4\%$ menos miofibroblastos em comparação ao controle, enquanto a aplicação de AO aumentou significativamente o número de células positivas para a marcação com α -SMA ($25,1 \pm 2,1$ células) em comparação com o grupo veículo ($3,8 \pm 1,7$ células) (Figura 20 A). O tratamento com Dersani® não alterou significativamente esse parâmetro em relação ao controle (Figura 20 A).

A Figura 20 B ilustra que as feridas dos animais imunossuprimidos coletadas no dia 7 após a excisão apresentaram $49,8 \pm 5,7\%$ menos miofibroblastos do que as do controle submetido à cicatrização fisiológica. O tratamento com OSMO reverteu essa situação, melhorando em $94,6 \pm 12,2\%$ a quantidade de células positivas para α -SMA (Figura 20 B). Apesar do veículo não ter causado alteração significativa, o tratamento com AO aumentou a quantidade de miofibroblastos em $77,6 \pm 22,13\%$ (Figura 20 B). O controle positivo Dersani® novamente não alterou significativamente esse parâmetro em relação ao controle imunossuprimido (Figura 20 B).

Na Figura 20 C observa-se que as feridas diabéticas retiradas no 7º dia após a excisão apresentaram $65,2 \pm 8,7\%$ menos miofibroblastos do que as dos animais do grupo controle. Do mesmo modo observado no processo de cicatrização desenvolvido pelos indivíduos imunossuprimidos, a aplicação de OSMO na ferida de animais diabéticos reverteu significativamente, restaurando a quantidade de miofibroblastos presentes, semelhante ao observado nos animais saudáveis do grupo controle (Figura 20 C). O tratamento com veículo não interferiu significativamente no número de células positivas para α -SMA na ferida diabética, mas o tratamento com AO causou aumento de quase duas vezes o número dessas células em relação ao apresentado pelo grupo diabético tratado com o veículo (Figura 20 C). Mais uma vez o tratamento com

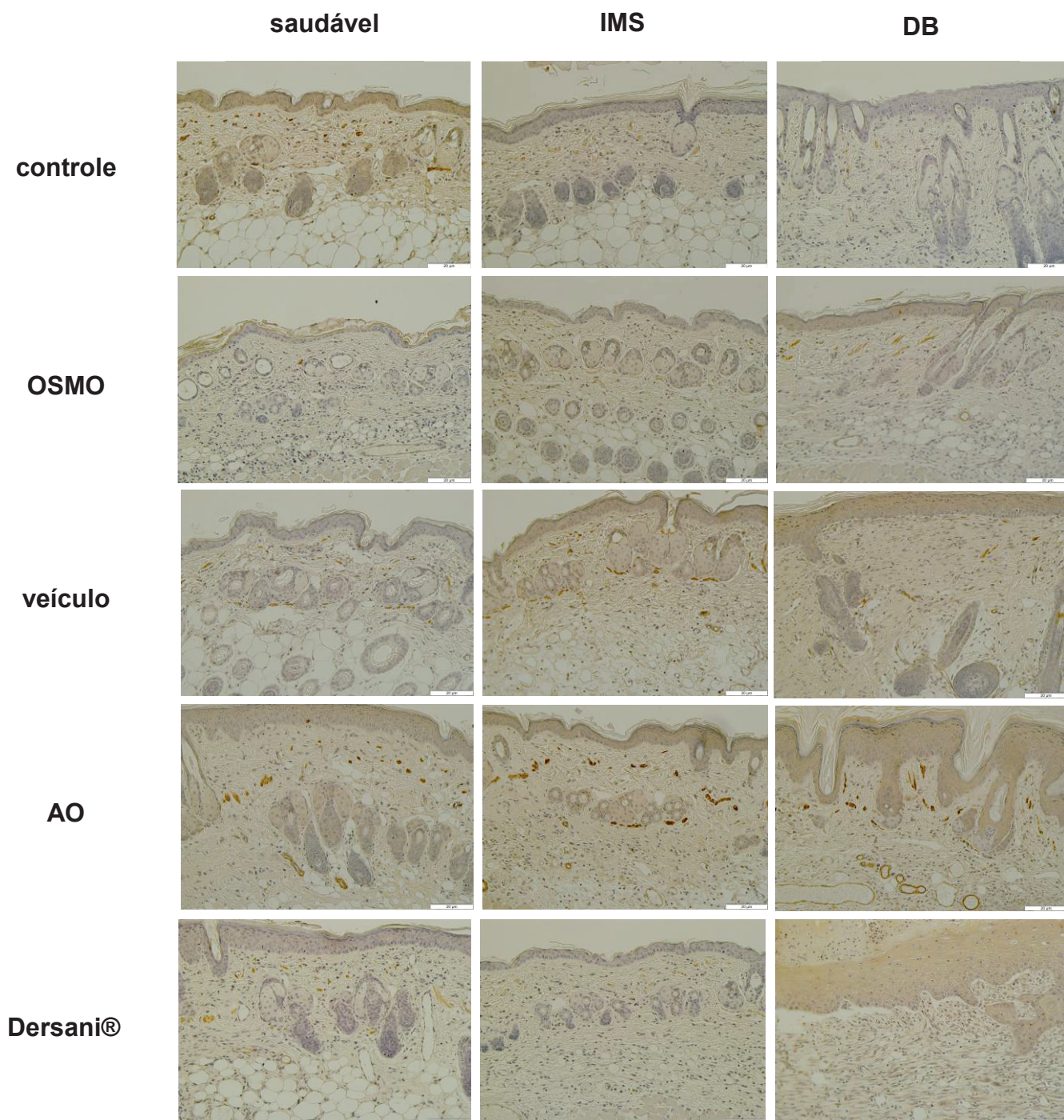
Dersani® não alterou significativamente esse parâmetro em relação ao controle diabético (Figura 20 C).

FIGURA 20 - EFEITO DO OSMO E AO NA SOBRE OS MIOFIBROBLASTOS NA FASE PROLIFERATIVA



Amostras foram coletadas das feridas no 7º dia após a excisão de animais controle, imunossuprimidos e diabéticos tratados por via tópica segundo as drogas indicadas. Foi feita a análise por imunohistoquímica usando anticorpos anti- α -SMA. Barras representam médias \pm E.P.M da contagem celular em cortes de três animais diferentes em cada grupo. O software Image J foi utilizado para processar as imagens e ANOVA de uma via e *post hoc* Bonferroni foram utilizados na análise estatística. A. Quantidade de miofibroblastos em animais controle. @@@@ $p < 0,001$ comparado ao grupo controle; #### $p < 0,001$ comparado ao grupo veículo. Controle: grupo não tratado; OSMO: grupo tratado com o óleo de sementes de *Moringa oleifera*; veículo: grupo tratado com óleo mineral, veículo usado para diluir o AO; AO: ácido oleico 70% diluído em óleo mineral; Dersani®: grupo tratado com óleo cicatrizante comercial. B. Quantidade de miofibroblastos em animais imunossuprimidos. @ $p < 0,05$ comparado ao grupo controle não imunossuprimido; * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle imunossuprimido; ## $p < 0,01$ comparado ao grupo veículo óleo mineral. Controle: grupo não tratado; controle imunossuprimido: grupo tratado com dexametasona; OSMO: imunossuprimidos tratados topicamente com óleo das sementes de *M. oleifera*; veículo: imunossuprimidos tratados topicamente com veículo óleo mineral; AO: imunossuprimidos tratados com AO diluído a 70% em veículo de óleo mineral; Dersani®: imunossuprimidos tratados topicamente com Dersani®. C. Quantidade de miofibroblastos de animais @@@ $p < 0,01$ comparado ao grupo controle não diabético; * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle diabético; ## $p < 0,01$ comparado ao grupo veículo óleo mineral. Controle: grupo não tratado; controle diabético: grupo tratado com STZ; OSMO: diabéticos tratados com óleo das sementes de *M. oleifera*; veículo: diabéticos tratados com veículo óleo mineral; AO: diabéticos tratados topicamente com AO 70% diluído em óleo mineral; Dersani®: diabéticos tratados topicamente com Dersani®.

FIGURA 1 - IMAGENS REPRESENTATIVAS DO EFEITO DO OSMO E AO SOBRE OS MIOFIBROBLASTOS NA FASE PROLIFERATIVA

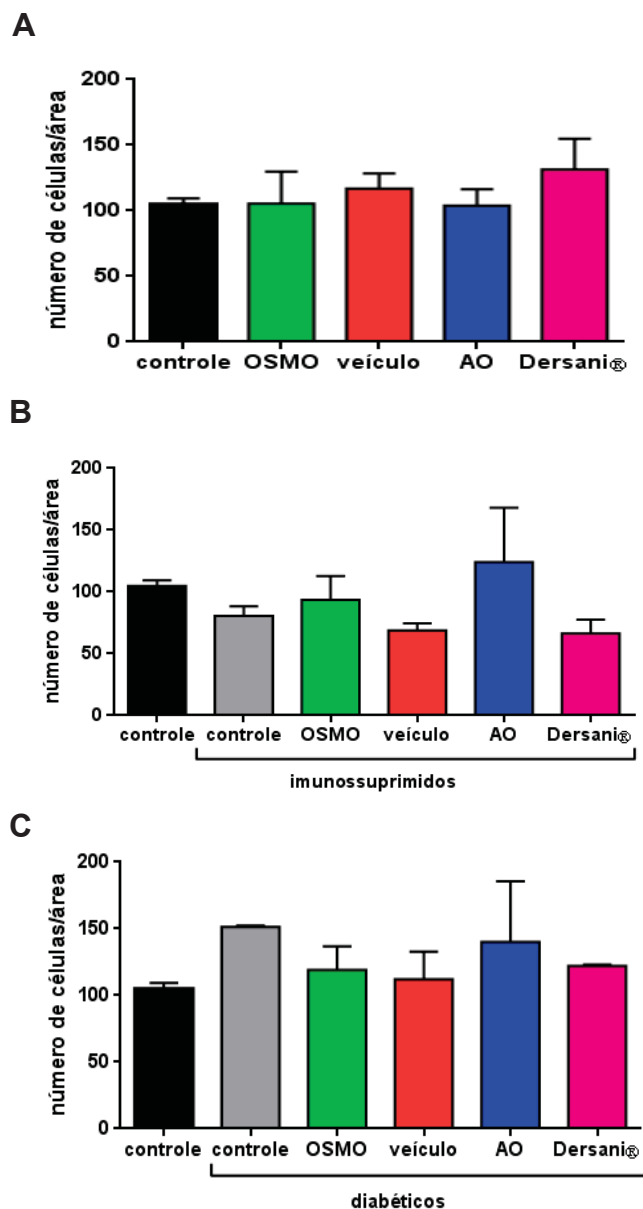


Sete dias após a excisão, animais controle, imunossuprimidos e diabéticos tratados topicamente foram eutanasiados e as feridas coletadas e submetidas à análise por imunohistoquímica usando anticorpos anti- α -SMA. Os cortes corados das feridas foram fotografados com magnificação de 100x. Células marcadas em marrom foram consideradas positivas. Setas pretas apontam células positivas para α -SMA. IMS: animais imunossuprimidos; DB: animais diabéticos; controle: animal não tratado; OSMO: camundongo tratado com o óleo das sementes de *M. oleifera*; veículo: animal tratado com óleo mineral; AO: camundongo tratado com ácido oleico; Dersani®: animal tratado com óleo comercial.

5.6 INFILTRAÇÃO CELULAR NO 2º DIA APÓS EXCISÃO

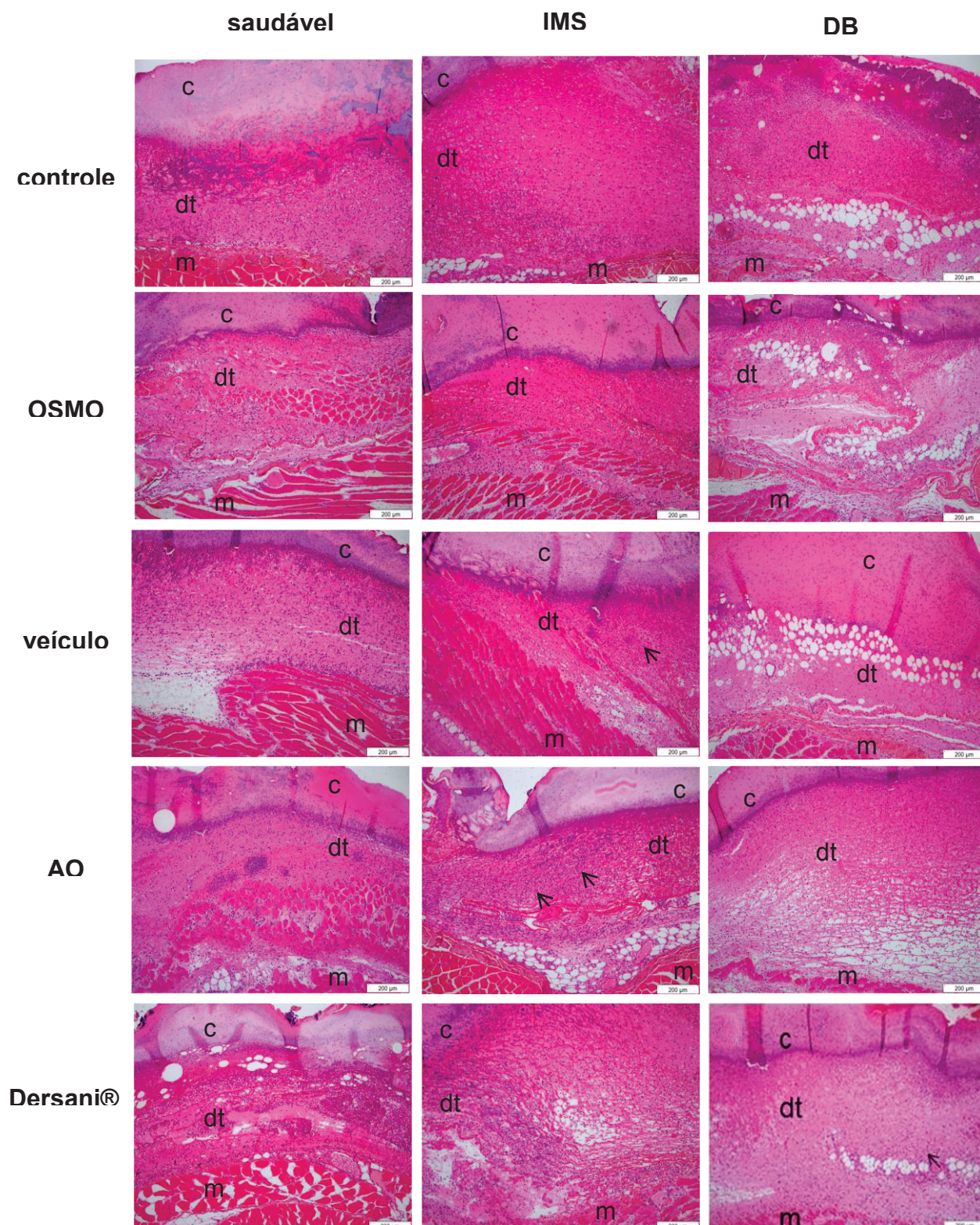
No segundo dia após a excisão, o processo de cicatrização se encontra na fase inflamatória, quando há a infiltração de leucócitos, principalmente neutrófilos e monócitos, a partir dos vasos sanguíneos para atuarem na área da ferida. Nas figuras 22 e 23 ilustra-se através da avaliação histológica com coloração de H&E a quantidade geral de células nesse ambiente, influenciada pelos tratamentos utilizados em cada grupo. Pode-se notar que nenhum dos tratamentos foi capaz de causar alteração significativa no total do número de células no 2º dia da cicatrização de animais saudáveis (Figuras 22 A e 23). Nenhuma diferença quanto à celularidade nessa etapa da fase inflamatória foi detectada entre as feridas de animais imunossuprimidos (Figura 22 B e 23) ou diabéticos (Figura 22 C e 23) concomitantemente tratadas com OSMO, veículo, AO ou Dersani®.

FIGURA 22 - EFEITO DO OSMO E AO NA SOBRE A CELULARIDADE TOTAL NA FASE INFLAMATÓRIA



Amostras foram coletadas das feridas no 2º dia após a excisão de animais controle, imunossuprimidos e diabéticos tratados por via tópica segundo as drogas indicadas. Foi feita a análise por histológica com coloração de HE. Barras representam médias \pm S.E.M de contagem celular total em pelo menos 5 áreas histológicas diferentes de pelo menos três animais em cada grupo **A.** Celularidade das feridas de animais saudáveis. Controle: grupo não tratado; OSMO: grupo tratado com o óleo de sementes de *Moringa oleifera*; veículo: grupo tratado com óleo mineral, veículo usado para diluir o AO; AO: ácido oleico 70% diluído em óleo mineral; Dersani®: grupo tratado com óleo cicatrizante comercial. **B.** Celularidade das feridas de animais imunossuprimidos. Controle: grupo não tratado; controle imunossuprimido: grupo tratado com dexametasona; OSMO: imunossuprimidos tratados topicamente com óleo das sementes de *M. oleifera*; veículo: imunossuprimidos tratados topicamente com veículo óleo mineral; AO: imunossuprimidos tratados com AO diluído a 70% em veículo de óleo mineral; Dersani®: imunossuprimidos tratados topicamente com Dersani®. **C.** Celularidade das feridas de animais diabéticos. Controle: grupo não tratado; controle diabético: grupo tratado com STZ; OSMO: diabéticos tratados com óleo das sementes de *M. oleifera*; veículo: diabéticos tratados com veículo óleo mineral; AO: diabéticos tratados topicamente com AO 70% diluído em óleo mineral; Dersani®: diabéticos tratados topicamente com Dersani®.

FIGURA 23 - IMAGENS REPRESENTATIVAS DO EFEITO DO OSMO E AO SOBRE A CELULARIDADE NA FASE INFLAMATÓRIA



Amostras foram coletadas das feridas no 2º dia após a excisão de animais controle, imunossuprimidos e diabéticos tratados por via tópica segundo as drogas indicadas. Foi feita a análise por histológica com coloração de HE. Os cortes corados das feridas foram fotografados com magnificação de 100x. Setas pretas apontam células infiltradas na ferida. c: coágulo, dt: tecido desorganizado, m: músculo. MS: animais imunossuprimidos; DB: animais diabéticos; controle: animal não tratado; OSMO: camundongo tratado com o óleo das sementes de *M. oleifera*; veículo: animal tratado com óleo mineral; AO: camundongo tratado com ácido oleico; Dersani®: animal tratado com óleo comercial.

6. DISCUSSÃO

As feridas crônicas, em contraste com o que ocorre com as feridas agudas, não passam por um processo de cicatrização ordenado, com progressão temporal, falhando em produzir um tecido íntegro do ponto de vista anatômico e funcional, e estendendo a duração do processo. As feridas de todos os tipos têm o potencial para se tornar crônicas, o que pode ser também em decorrência de supressão do sistema imunológico e diabetes (WERDIN *et al.*, 2008). De forma geral, as feridas crônicas prejudicam a qualidade de vida dos pacientes, uma vez que causam dor, desconforto e limitações físicas, afetando atividades rotineiras como recreação, esportes e trabalho (KAPP *et al.*, 2017).

Com o intuito de se investigar acerca da influência do OSMO – e a contribuição do seu constituinte principal AO – na cicatrização crônica, camundongos saudáveis foram submetidos a um protocolo de imunossupressão com a utilização do glicocorticoide dexametasona. Considerando a importância do sistema imunológico para a inflamação e o processo de cicatrização, a atenuação das vias de sinalização envolvidas e a consequente supressão da produção de mediadores inflamatórios e da ativação de células do sistema imunológico (CAIN e CIDLOWSKI, 2017), certamente prejudica o equilíbrio do processo. Os glicocorticoides exercem efeito imunossupressor por diversos mecanismos, dentre os quais o genômico, que se apresenta a partir de 20 minutos da ligação do glicocorticoide em seu receptor, quando o complexo adentra o núcleo celular e se liga direta ou indiretamente, por mediação de fatores de transcrição como NFkB, (ativador de proteína-1) AP-1 e (fator nuclear de células T ativadas) NFAT e STAT, em sequências de DNA conhecidas como elementos positivamente responsivos aos glicocorticoides ou às conhecidas como elementos negativamente responsivos aos glicocorticoides, limitam a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias e ativam os genes de citocinas anti-inflamatórias (ZEN *et al.*, 2011). Além disso, pode haver regulação epigenética, com a desacetilação de histonas e aumento da densidade da cromatina, o que induz o silenciamento gênico ou, em outros casos, a acetilação do DNA e a consequente ativação de genes envolvidos na transcrição de proteínas anti-inflamatórias. Os glicocorticoides podem ainda interagir com a estrutura da bicamada lipídica na

membrana plasmática ou mesmo na membrana mitocondrial, alterando suas propriedades físico-químicas ou se ligando a moléculas como canais iônicos (ZEN *et al.*, 2011). Já os efeitos rápidos dos glicocorticoides são explicados pelo mecanismo de ação não genômico, no qual o complexo de sinalização do receptor de células T (TCR) nos linfócitos T é bloqueado devido à ligação do glicocorticoide e seu receptor ao TCR, o que ocasiona a inibição *downstream* da sua via (LOWENBERG *et al.*, 2007). Os efeitos desencadeados por esse tratamento incluem a supressão da expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias com consequente inibição da função dos macrófagos e a modulação da resposta imunológica adaptativa através de efeito negativo sobre a função dos linfócitos T (LIM *et al.*, 2007). Os glicocorticoides atuam ainda sobre a sobrevivência, proliferação e função dos linfócitos B e interferem na maturação e função de leucócitos como neutrófilos e eosinófilos (ZEN *et al.*, 2011). Dessa forma, o tratamento usado no presente estudo para suprimir o sistema imunológico parece ter sido efetivo, uma vez que reduziu o número de leucócitos e linfócitos sanguíneos. Ainda, foi eficaz em diminuir o tamanho e o peso dos órgãos do sistema imunológico timo e baço, responsáveis, respectivamente, pela maturação dos linfócitos T e B, e dos linfonodos, os principais sítios de ocorrência linfocitária.

Houve o interesse na investigação dos efeitos do OSMO e do AO em um segundo protocolo de cicatrização crônica, e, para possibilitar tal pesquisa, diabetes foi induzida em camundongos. Sabe-se que altos níveis de glicemia ocasionam deficiências circulatórias significativas para o processo de cicatrização, como redução do tamanho capilar, engrossamento da membrana basal e hialinose arteriolar. Ocorrem também anormalidades na musculatura lisa e vasoconstrição devido à redução de vasodilatadores. Esses fatores levam à isquemia e dano nas fibras nervosas. A neuropatia é agravada ainda pela formação de produtos finais de glicação avançada (DAVIS *et al.*, 2018), que se formam a partir da combinação não enzimática da glicose e outros açúcares com proteínas e lipídios e se ligam às fibras de colágeno originando anormalidades nas ligações cruzadas na membrana basal da MEC, o que dificulta o seu remodelamento durante a cicatrização (AHMED *et al.*, 2016).

Como esperado, devido a todas as consequências negativas decorrentes da imunossupressão e diabetes, os animais submetidos à excisão cutânea previamente tratados com dexametasona e STZ apresentaram prolongamento

do tempo necessário para a oclusão das feridas, exibindo fechamento tardio em relação à cicatrização dos animais saudáveis. O tratamento das feridas crônicas com OSMO e especialmente AO antecipou o seu fechamento. Ambos tiveram efeito inclusive sobre a cicatrização aguda, melhorando a taxa de cicatrização de animais saudáveis.

Com o propósito de se averiguar o possível modo de ação envolvido no efeito pró-cicatrizante, determinaram-se os níveis de colágeno presentes na derme durante a fase proliferativa e na fase de remodelamento por duas técnicas diferentes. Primeiro realizou-se a detecção do aminoácido HYP, presente exclusivamente no colágeno, e, após, foi feita a análise histológica. Em ambas as metodologias, houve redução dos níveis de colágeno presentes nas feridas de animais imunossuprimidos e diabéticos. Sendo que o tratamento com OSMO e AO atuou de forma positiva sobre o conteúdo de colágeno na cicatrização, restaurando os seus níveis para valores similares aos encontrados nas feridas de animais saudáveis no decorrer do processo. É possível que o AO atue, ainda, favorecendo a deposição de colágeno na cicatrização aguda.

Esses resultados acerca da importante ação pró-fibrótica do OSMO na cicatrização crônica são inéditos na literatura. Mas, apesar de apresentarem constituição diversa da exibida pelo OSMO, outras partes de *M. oleifera* parecem favorecer o aumento do colágeno e estimular a atividade dos fibroblastos. Fernandes e colaboradores (2016) documentaram um estudo a respeito da atividade do extrato da flor na promoção da proliferação e migração dessas células. Ainda, o extrato metanólico e a sua fração aquosa correspondente, rica em Vicenina-2, induziram a proliferação, viabilidade e migração de fibroblastos (MUHAMMAD *et al.*, 2013) e a fração etil-acetato das folhas de *M. oleifera*, nas doses 12,5 ug/mL, 25 ug/mL e 50 ug/mL apresentaram efeito proliferativo e migratório sobre fibroblastos *in vitro* (GOTHA *et al.*, 2016). Nesta linha, um curativo para feridas contendo extrato aquoso das folhas de *M. oleifera* apresentou efeito sobre a proliferação e migração não só de fibroblastos, mas de queratinócitos (CHIN *et al.*, 2018).

Apesar de todos os fibroblastos na derme parecerem similares do ponto de vista morfológico, eles possuem funções distintas, diversos padrões de expressão molecular e se localizam em diferentes regiões anatômicas. Sendo assim, existem diferentes linhagens de fibroblastos. Os fibroblastos da

linhagem reticular secretam densas fibras de colágeno que promovem integridade estrutural e resistência à pele. Eles povoam a área da injúria imediatamente após a lesão, em contraste com os fibroblastos da linhagem papilar, que aparecem mais tarde e tem papel menos proeminente no processo, uma vez que produzem colágeno menos organizado e mais frouxo (THULABANDU *et al.*, 2017). De fato, um estudo recente apontou a presença de pelo menos três subpopulações de fibroblastos atuando na cicatrização, sendo que as mais ativas estavam relacionadas a uma cicatrização acelerada, enquanto que as menos ativas indicavam um processo crônico. Cada uma das subpopulações expressava uma pletora de genes distintos, parecendo desempenhar diferentes funções (MAHMOUDI *et al.*, 2019).

Os miofibroblastos são uma população celular derivada a partir dos fibroblastos estimulados por fatores de crescimento como PDGF e TGF- β ou pela própria tensão exercida durante a síntese e deposição das fibras da MEC. Antigamente acreditava-se que a contração do tecido de granulação durante a cicatrização dependia exclusivamente da força gerada neste tecido através da migração dos fibroblastos sobre o substrato e do encurtamento das fibras colágenas. Contudo, há cerca de vinte anos, tornou-se aceito que essas forças tradicionais geradas pelos fibroblastos são suficientes apenas para iniciar o fechamento da ferida e a subsequente resistência que o tecido oferece desencadeia a diferenciação dos miofibroblastos. Neste processo, os fibroblastos estimulados tornam-se paralelamente orientados em relação à ferida e passam a expressar α -SMA e colágeno do tipo I (TOMASEK *et al.*, 2002). No presente estudo, OSMO e AO restauraram a quantia de miofibroblastos ao nível fisiológico em ambos os casos de feridas crônicas. Esse fato pode estar relacionado ao efeito indutor de colágeno previamente notado, uma vez que o aumento da tensão e a produção de força pelos componentes da MEC, diretamente influenciados pelos níveis de colágeno presentes, são fatores importantes para a diferenciação dos miofibroblastos.

Outro fator importante para o surgimento de miofibroblastos e também fundamental para que haja a síntese de componentes da MEC é a liberação de TGF- β por leucócitos, em especial por macrófagos do tipo M2 (TOMASEK *et al.*, 2002; YUNNA *et al.*, 2020; MACLEOD e MANSBRIDGE, 2016). Os macrófagos são células altamente heterogêneas que podem mudar rapidamente suas funções em resposta a sinais ambientais e, após promover a

inflamação, convertem-se do fenótipo M1 para o fenótipo M2 para mediar uma resposta regenerativa. Uma vez que estudos como o de Camell e Smith (2013), que identificou regulação positiva do AO na expressão do gene típico de M2 ARG1, e o de Lovazsi e colaboradores (2017), que reportou maior expressão dos marcadores M2 CD206 e CD209 devido ao uso de AO, indicam que a polarização dos macrófagos M1 para o fenótipo alternativo M2 pode ser promovida com o tratamento por AO, acredita-se que o AO possa exercer papel positivo sobre o conteúdo de colágeno na ferida e também sobre a quantidade de miofibroblastos por outros mecanismos que não só o estímulo da tensão na derme pela deposição acentuada de tecido conectivo. Mecanismos, estes, que envolveriam a diferenciação de um tipo celular em outro, no caso de macrófagos M1 em macrófagos M2, e a consequente regulação da fase inflamatória. A alteração de fenótipos celulares, ao invés de apenas a migração e proliferação, poderia inclusive explicar o porquê do presente estudo não encontrar diferença significativa entre os tratamentos na quantificação da celularidade total durante a fase inflamatória da cicatrização. Até porque as propriedades moduladoras da inflamação exercidas pelo OSMO e AO já foram reconhecidas. Em um estudo recente, OSMO reduziu a neurotoxicidade do metotrexato, diminuindo os níveis de TNF- α , IL-6 e NO em pacientes com câncer (FAMUREWA *et al.*, 2019). A atividade anti-inflamatória de OSMO é corroborada pelo trabalho de Cretella e colaboradores (2020), que postula que a aplicação tópica de OSMO e AO em modelo de edema de orelha reduz a espessura do edema e a migração de neutrófilos. Já o estudo de Pereira e colaboradores (2008) identifica aumento do número de neutrófilos na área lesionada e da secreção de IL-1 β nas fases iniciais da reparação das feridas pelo tratamento com AO. O efeito pró-inflamatório do AO também é descrito no trabalho de Smith e colaboradores (2017), no qual a exposição *in vitro* ao AO induziu células tronco mesenquimais a aumentar a secreção de mediadores como NO e IL-6 (SMITH *et al.*, 2017). Rodrigues e colaboradores (2012) sugeriram que o AO aceleraria a fase inflamatória da cicatrização normal de feridas ao aumentar a concentração de TNF- α , mas reduzir as concentrações de IL-1, IL-6, e (proteína inflamatória de macrófagos-3 α) MIP-3 α . Do mesmo modo, Cardoso e colaboradores (2011) descreveram um aumento na expressão de TNF- α , IL-17 e IL-10, assim como níveis elevados de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de colágeno III, inibidor de

metaloprotease 1 (TIMP1) e MMP9 120 horas após a excisão em feridas saudáveis tratadas com AO.

Esses dados evidenciam que o OSMO e AO poderiam atuar ao promover uma inflamação eficiente e acelerada, que estimularia adequadamente a atividade de fibroblastos, miofibroblastos de contração da ferida e regulação da deposição de matriz por MMPs/TIMPs, tais como MMP9.

De fato, outras partes de *M. oleifera* apresentam propriedades imunomoduladoras. A ação anti-inflamatória de *M. oleifera* foi demonstrada por diversos trabalhos. O uso tópico do extrato etanólico das folhas em queratinócitos estimulados ocasionou a redução da expressão de TNF- α , CCL17, IL-1 β e IL-6 (CHOI *et al.*, 2016). A fração etil acetato das folhas de *M. oleifera* demonstrou produção reduzida de mediadores pró-inflamatórios como NO e citocinas pró-inflamatórias a nível de transcrição gênica e de expressão proteica em macrófagos estimulados com LPS *in vitro* e regulou a via do NF-kB (ARULSELVAN *et al.*, 2016; LUETRAGOON *et al.*, 2020). Glicosídeos fenólicos da fração etil acetato dos frutos de *M. oleifera* também apresentaram efeito inibitório sobre o NO em macrófagos ativados por LPS (CHEENPRACHA *et al.*, 2010). Da mesma forma, a moringina, um isotiocianato comestível, precursor de glucosinolatos de *M. oleifera*, inibiu o NF-kB induzido por TNF- α , via inibição de STAT5 e parcialmente de STAT1 e 2 (MICHL *et al.*, 2016). Estudos com o extrato aquoso das folhas de *M. oleifera* também indicam uma atividade anti-inflamatória, demonstrando sub-regulação de mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, NOS e COX-2 e correlacionando esse efeito a uma ação pró-cicatrizante em feridas de animais diabéticos (AZEVEDO *et al.*, 2018; MUHAMMAD *et al.*, 2016). Corroborando a atividade cicatrizante de *M. oleifera*, Parwani e colaboradores (2016) desenvolveram um curativo na forma de hidrogel, composto por polissacarídeos das sementes de planta e álcool polivinílico, considerado benéfico para feridas com pouco exsudato, já que exibiu boa respirabilidade, hemocompatibilidade, atividade bactericida, ação antioxidante e desencadeou rápida re-epitelização de feridas. Contudo, muitos estudos reportam a propriedade hipoglicemiante das folhas de *M. oleifera*. Portanto, a redução da glicemia e, como consequência, o controle dos efeitos sistêmicos da glicose, poderia ser um outro mecanismo pelo qual indivíduos diabéticos se beneficiam durante o tratamento de feridas. As doses preferencialmente usadas nos ensaios com animais são 100, 200 e 300 mg/Kg

das folhas e o tratamento costuma durar 12 semanas, apesar de poucos deles analisarem um período menor, de 6 a 8 semanas. É possível que compostos presentes nas folhas atuem competindo com a glucose pelos receptores proteínas transportadoras de glucose 2 e 4 (GLUT2 e GLUT4), além de aumentarem a expressão desses receptores e a sensibilidade da molécula de insulina. Também existem indícios do aumento da liberação de insulina e da inibição da atividade de enzimas intestinais responsáveis pela digestão de carboidratos (AHMAD *et al.*, 2019). Entretanto, não se sabe se essa atividade hipoglicemiante também estaria presente em OSMO. A questão permanece, embora deva se considerar que se tratam de diferentes partes da planta, cada qual constituída de forma bastante distinta.

Se a atividade indutora de inflamação rápida e eficiente, e de consequente adequada fibroplasia, do OSMO e AO for considerada verdadeira, esses tratamentos poderiam reverter nas feridas crônicas, diabéticas e imunossuprimidas, o quadro de inflamação de baixo grau, caracterizada pela produção crônica de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6 e pela reprogramação dos macrófagos a um perfil ativado de modo clássico (RAMALHO *et al.*, 2008). Quando há redução no número de linfócitos envolvidos na cicatrização, como é o caso na cicatrização de indivíduos imunossuprimidos, há um atraso no processo, bem como um impacto negativo sobre a qualidade do produto formado (ZEN *et al.*, 2011). Entretanto, a exposição da ferida a agentes promotores da função dos linfócitos é capaz de reestabelecer a normalidade do processo. No caso da cicatrização diabética, a hiperglicemia também diminui proliferação e função de linfócitos T, além de ocasionar quimiotaxia reduzida em neutrófilos e monócitos, assim como inibição da aderência leucocitária e da fagocitose. (AHMED *et al.*, 2016). Há aumento dos níveis sistêmicos de leucotrienos, como LTB₄, e de outros mediadores inflamatórios, como IL-6, IL-12 e IFN- γ , o que certamente acarreta em uma polarização para o fenótipo inflamatório M1 na população de macrófagos (RAMALHO *et al.*, 2008). A inibição de vias inflamatórias que desencadeiem na liberação de citocinas e a indução da polarização de macrófagos no sentido macrófagos M2 favorecem a cicatrização (MIRZA *et al.*, 2011).

Dessa forma, a modulação da inflamação é necessária nos casos de cicatrização crônica e o fato de ela ser executada por OSMO e AO pode

explicar os resultados obtidos com o tratamento de AO no estudo pré-clínico de Edwards e colaboradores (2007), que produziram um curativo para feridas crônicas e observaram que o AO inibiu a atividade das enzimas elastase e catepsina G, resultantes da presença alterada de neutrófilos nas lesões. A modulação da inflamação também pode explicar os resultados do ensaio clínico de Gallelli e colaboradores (2019), que aplicaram em feridas de pacientes diabéticos um hidrogel com quercetina e AO. Eles perceberam que os pacientes tratados apresentaram menos dor e desconforto, sendo que após um mês de tratamento, dezenove desses pacientes tiveram cicatrização completa, enquanto somente nove exibiam o mesmo quadro no grupo controle. Em 60 dias, vinte e seis pacientes diabéticos tratados com AO e quercetina apresentavam total re-epitelização e somente dezesseis do grupo controle tinham suas feridas fechadas. Os pacientes do grupo controle, passados para o tratado, cicatrizaram em um mês e apenas dois de cinquenta e seis permaneceram não responsivos ao tratamento após três meses.

Durante a fase inflamatória da cicatrização, são produzidas pela NADPH oxidase, um complexo enzimático expresso em altos níveis por leucócitos, grandes quantidades de ROS. Elas são essenciais para sinalização celular e necessárias para a defesa contra patógenos, estando, dessa forma, diretamente envolvidas na resposta imunológica e no processo de cicatrização. Fisiologicamente, são produzidas por todas as células durante os processos metabólicos, como por exemplo na cadeia respiratória, mas, durante a inflamação, no *burst* respiratório, têm papel de fundamental importância (SCHAFFER e WERNER, 2008), sendo que alterações nesse parâmetro podem influenciar a cicatrização como um todo. Estudos sugerem uma atividade antioxidante de OSMO, o que pode ser relacionado, inclusive, a sua descrita ação anti-inflamatória. O tratamento com OSMO via i.p. reduziu os níveis de enzimas de estresse oxidativo, como malondialdeído, e aumentou os níveis de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase, bem como restaurou os níveis renais de IL-1 β , IL-6, TNF- α e NO e inibiu NF- κ B, NOS e a atividade da caspase 3 em ratos tratados com o antibiótico citotóxico gentamicina (EDEOGU *et al.*, 2020). O potencial antioxidante de OSMO, nesse estudo por via oral, também foi validado, reduzindo a inflamação e a neurotoxicidade induzidas pelo metotrexato em ratos (FAMUREWA *et al.*, 2019). Em contrapartida, aparentemente o AO é capaz de estimular a produção

de ROS em leucócitos (LEVADA-PIRES *et al.*, 2008; CARILLO *et al.*, 2011). A promoção da atividade mitocondrial pode estar relacionada com a evidência de que o AO regula a expressão gênica para estimular uma rápida e eficiente inflamação, uma atividade custosa do ponto de vista energético (LIMA *et al.*, 2002; VERLENGIA *et al.*, 2003; LACETERA *et al.*, 2002). Contudo, deve-se atentar para a dose utilizada desse ácido graxo, uma vez que o aumento de ROS também pode estar relacionado à citotoxicidade. Baixas concentrações de AO (30-90 μM) por até 48 h não apresentaram efeito sobre a viabilidade da linhagem de linfócitos T Jurkat mensurada por Azul de Trypan (SIDDIQUI *et al.*, 2001). Na verdade, concentrações mais baixas de AO (25 μM -150 μM), além de serem ineficientes em gerar toxicidade, estimularam a proliferação celular induzida pela Concanavalina A (VERLENGIA *et al.*, 2003). O mesmo resultado foi observado por Padovese e Curi (2009) em linfócitos humanos estimulados com Concanavalina A e tratados com AO na concentração 25 μM . A ativação celular também fica evidente na análise da influência do tratamento sobre a fagocitose, facilitada em neutrófilos tratados com AO a 10-150 μM (PADOVESE e CURI, 2009), e no aumento da adesão de monócitos tratados com AO na concentração 50 μM . Entretanto, altas concentrações do AO (200 μM) reduziram a viabilidade dos linfócitos B da linhagem Raji e de linfócitos isolados de sangue humano no protocolo de intercalação com iodeto de propídio (PI) no DNA analisado em citometria de fluxo (CURY-BOAVENTURA *et al.*, 2005). A redução da viabilidade foi também observada por Hoque e colaboradores (2013) usando anexina V em células Jurkat incubadas por 24 h com AO (700 μM). Hoque e colaboradores (2013) documentaram que esse tratamento causou um aumento na externalização de fosfatidilserina, um sinalizador primário de apoptose. Essa descoberta está de acordo com o que um grupo de pesquisa brasileiro publicou em uma série de artigos a respeito da toxicidade do AO sobre linfócitos. Eles encontraram que o AO promove a apoptose e necrose, além de induzir fragmentação de DNA, condensação de cromatina, desintegração de membrana e alterações no potencial transmembrana mitocondrial foram outras características postuladas pelo mesmo grupo (CURY-BOAVENTURA *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 2002; LEVADA-PIRES *et al.*, 2008). Contudo, torna-se importante mencionar que os ensaios que levantam uma possível atividade citotóxica de AO em leucócitos foram realizados *in vitro*,

com o uso de altas concentrações desse ácido graxo, ou seja, caracterizados por metodologias bastante diversas das utilizadas no presente estudo.

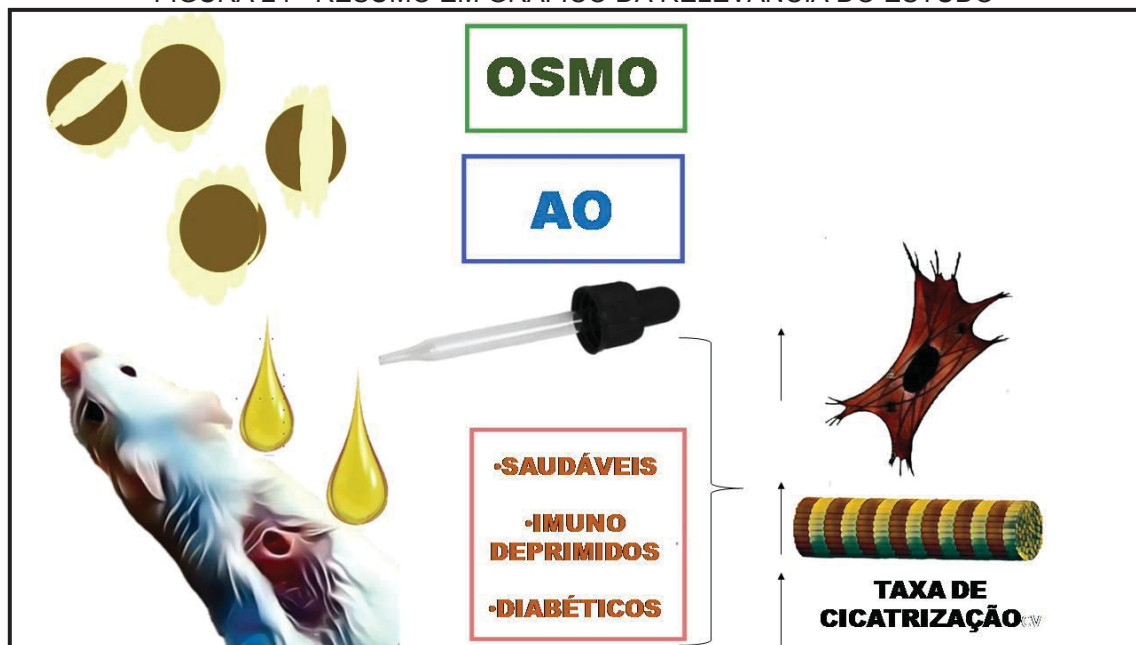
Os resultados obtidos apontam que o óleo mineral, utilizado como veículo do AO neste estudo, nem sempre tem ação inerte, visto seu efeito inibidor do conteúdo de HYP e da presença de miofibroblastos na fase proliferativa da cicatrização. Este estudo contou com controles que possibilitaram melhor análise dos dados e detectaram alterações inesperadas. Entretanto preocupa o fato de que o óleo mineral é frequentemente usado em estudos da área como único controle para comparação de efeito de novos tratamentos (DONATO-TRANCOSO *et al.*, 2014; LANIA *et al.*, 2017).

Igualmente inesperada foi a ação do óleo cicatrizante comercial Dersani®. Além de muitas vezes não apresentar alteração significativa sobre os parâmetros de cicatrização analisados, o óleo teve efeito negativo sobre a taxa de fechamento das feridas dos indivíduos diabéticos. Corroboram esses resultados, outros estudos nos quais o uso de Dersani® não apresentou benefícios sobre a cicatrização. No estudo de Bianchi e colaboradores (2018), Dersani® foi o único tratamento que não apresentou redução da taxa de cicatrização na fase inflamatória. Mesmo no 12º dia após a indução da lesão, alguns animais sob essa intervenção ainda apresentavam sinais de hemorragia e edema local. Observou-se dificuldade no fechamento das lesões tratadas com Dersani® também no estudo de Parisotto-Peterle e colaboradores (2020). O mecanismo de ação pelo qual Dersani® atuaria envolveria a promoção da quimiotaxia celular e a liberação de fatores de crescimento (BIANCHI *et al.*, 2018). Contudo, acredita-se que, por ser rico em ácido linoleico, ácido graxo reconhecido por não favorecer um ambiente anti-inflamatório e pró-fibrótico, mas, pelo contrário, induzir a inflamação, Dersani® não tenha tido ação favorável nos casos de cicatrização crônica analisados (GUIDONI *et al.*, 2019; PARISOTO-PERLE *et al.*, 2020; LORDANI *et al.*, 2015).

Por fim, reforça-se a questão levantada por Xiao e colaboradores (2020), a qual pondera se os ingredientes ativos, extraídos das diferentes partes de *M. oleífera*, interagem entre si de forma a atenuar o seu efeito sobre o sistema imunológico e por quais mecanismos eles atuam. A respeito do OSMO, é possível que outros compostos além de AO interfiram em seu efeito benéfico sobre a progressão da cicatrização aguda e crônica e sobre a sua atividade promotora de colágeno e da presença de miofibroblastos, contudo, os

mecanismos por eles utilizados para alcançar esses resultados devem ser melhor esclarecidos. Portanto, mais estudos sobre o tema devem ser elaborados.

FIGURA 24 - RESUMO EM GRÁFICO DA RELEVÂNCIA DO ESTUDO



Feridas de camundongos saudáveis, imunossuprimidos e diabéticos tratadas por via tópica com OSMO e seu constituinte principal AO apresentaram melhora na taxa de cicatrização, aumento dos níveis de colágeno e da presença de miofibroblastos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação tópica de OSMO, bem como seu composto majoritário AO, normalizou o tempo de cicatrização de feridas crônicas em camundongos imunossuprimidos e diabéticos, sendo eficazes inclusive em acelerar a cicatrização em camundongos saudáveis. O mecanismo de reparação envolve um aumento na quantidade de colágeno na área da injúria e uma regularização na presença dos miofibroblastos. Esses resultados indicam que o AO é o composto responsável pelo efeito cicatrizante do OSMO, contudo, outros constituintes podem estar interferindo nessa ação. Estudos posteriores devem ser conduzidos para que se entenda o mecanismo pelo qual OSMO e AO atuam. Por fim, pode-se então dizer que o uso popular do OSMO como agente cicatrizante foi demonstrado como potencialmente eficaz neste estudo.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, J.; KHAN, I.; BLUNDELL, R. *Moringa oleifera* and glycemic control: A review of current evidence and possible mechanisms. **Phytoter Res**, p. 1-8, 2019.
- AHMED, A.S.; ANTONSEN, E.L. Immune and vascular dysfunction in diabetic wound healing. **J Wound Care**, v. 25, n. 7, p. S35-S46, 2016.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Ed. Artmed. 4^a ed. Porto Alegre, 2010.
- ARAGONA, M.; DEKONINCK, S.; RULANDS, S.; LENGLEZ, S.; MASCRÉ, G.; SIMONS, B.D.; BLANPAIN, C. Defining stem cell dynamics and migration during wound healing in mouse skin epidermis. **Nat Commun**, v. 8, p.14684, 2017.
- ARAÚJO, L.C.C.; AGUIAR, J.S.; NAPOLEÃO, T.H.; MOTA, F.V.B.; BARROS, A.L.S.; MOURA, M.C.; CORIOLANO, M.C.; COELHO, L.C.B.B.; SILVA, T.G.; PAIVA, P.M.G. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81973, 2013.
- ARULSELVAN, P., TAN, W.S., GOTHAI, S., MUNIANDY, K., FAKURAZI, S., ESA, N.M., ALARFAJ, A.A., KUMAR, S.S. Anti-Inflammatory potential of ethyl acetate fraction of *Moringa oleifera* in downregulating the NF-κB signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1452, 2016.
- AZEVEDO, Í.M.; ARAÚJO-FILHO, I.; TEIXEIRA, M.M.A.; MOREIRA, M.D.F.C.; MEDEIROS, A.C. Wound healing of diabetic rats treated with *Moringa oleifera* extract. **Acta Cir. Bras**, v. 33, n. 9, p. 799-805, 2018.
- BASQUERIZO-NOLE, K.L.; FOX, J.D.; KIRSNE, R.S. In search of a proportionate funding in medicine. **JAMA Dermatol**, v. 151, n. 6, 583-584, 2015.
- BEVILACQUA, M.; POBER, J.; WHEELER, M.; COTRAN, R.S.; GIMBRONE JR, M.A. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. **J Clin Invest**, v. 76, p. 2003, 1985.
- BHATTACHARYA, A.; MANDAL, S. Pollination, pollen germination and stigma receptivity in *Moringa oleifera* Lamk. **Grana**, v. 43, p. 48-56, 2004.

- BIANCHI, S.E.; MACHADO, B.E.K.; DA SILVA, M.G.C.; DA SILVA, M.M.A.; BOSCO, L.D.; MARQUES, M.S.; HORN, A.P.; PERSICH, L.; GELLER, F.C.; ARGENTA, D.; TEIXEIRA, H.F.; SIMÕES, C.M.O.; DORA, C.L.; BASSANI, V.L. Coumestrol/hydroxypropyl- β -cyclodextrin association incorporated in hydroxypropyl methylcellulose hydrogel exhibits wound healing effect: in vitro and in vivo study. **Eur J Pharm Sci**, v. 119, p. 179-188, 2018.
- BLECHER, K.; MARTINEZ, L.R.; TUCKMAN-VERNON, C.; NACHARAJU, P.; SCHAIRER, D.; CHOUAKE, J.; FRIEDMAN, J.M.; ALFIERI, A.; GUHA, C.; NOSANCHUK, J.D.; FRIEDMAN, A.J. Nitric-oxide releasing nanoparticles accelerate wound healing in NOD-SCID mice. **Nanomedicine**, v. 8, p. 1364-1371, 2012.
- BROUGHTON, G.; JANES, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. **Plast Reconstr Surg**, v. 117, p. 1e-S-32e-S, 2006.
- BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J Nat Product**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.
- CAIN, D.W.; CIDLOWSKI, J.A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nat Rev Immunol**, v. 17, n. 4, p. 233-247, 2017.
- CALIXTO, J. B. Twenty five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J Ethnopharmacol**, v. 100, p. 131-134, 2005.
- CAMELL, C.; SMITH, C. W. Dietary oleic acid increases M2 macrophages in the mesenteric adipose tissue.. **Plos One**, v. 8, n. 9, 2013.
- CARDOSO, C.R.; FAVORETO JR, S.; OLIVEIRA, L.L.; VANCIM, J.O.; BARBAN, G.B.; FERRAZ, D.B.; SILVA, J.S. Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: a new approach for skin repair. **Immunobiology**, v. 216, p. 409-415, 2011.
- CARRILLO, C.; CAVIA, M.D.M.; ROELOFS, H.; WANTEN, G.; ALONSO-TORRE, S.R. Activation of human neutrophils by oleic acid involves the production of reactive oxygen species and a rise in cytosolic calcium concentration: a comparison with N-6 polyunsaturated fatty acids. **Cell Physiol Biochem**, v. 28, n. 2, p. 329-38, 2011.
- CHEENPRACHA, S.; PARK, E.J.; YOSHIDA, W.Y.; BARIT, C.; WALL, M.; PEZZUTO, J.M.; CHANG, L.C. Potential anti-inflammatory phenolic glycosides from the medicinal plant *Moringa oleifera* fruits. **Bioorg Med Chem**, v. 18, n. 17, p. 6598-6602, 2010.

- CHIN, C.; PEI, J.J.; NG, P.Y.; NG, S. Development and formulation of *Moringa oleifera* standardised leaf extract film dressing for wound healing application. **J Ethnopharmacol**, v. 212, p. 188-199, 2018.
- CHOI, S.H.; GHARAHMANY, G.; WALZEM, R.L.; MEADE, T.H. SMITH, S.B. Ground beef high in total fat and saturated fatty acids decreases X receptor signaling targets in peripheral blood mononuclear cells of men and women. **Lipids**, v. 53, n. 3, p. 279-290, 2018.
- CRETELLA, A.B.M.; DA SILVA, B.S.; PAWLOSKI, P.L.; RUZISKA, R.M.; SCHARF, D.R.; ASCARI, J.; CABRINI, D.A.; OTUKI, M.F. Expanding the anti-inflammatory potential of *Moringa oleifera*: topical effect of seed oil on skin inflammation and hyperproliferation. **J. Ethnopharmacol**, v. 254, p. 112708, 2020.
- CUI, J.; CHEN, Y.; WANG, H.Y.; WANG, R. Mechanisms and pathways of innate immune activation and regulation in health and cancer. **Hum Vaccin Immunother**, v. 10, n. 11, p. 3270-3285, 2014.
- CURY-BOAVENTURA, M. F.; POMPEIA, C.; CURI, R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. **Clin Nutr**, v. 23, n. 4, p. 721-732, 2004.
- CURY-BOAVENTURA, M. F.; POMPEIA, C.; CURI, R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Raji cells. **J Nutr**, v. 21, n. 3, p. 395-405, 2005.
- DAVIS, F.M.; KIMBALL, A.; BONIAKOWSKI, A.; GALLAGHER, K. Dysfunctional wound healing in diabetic foot ulcers: new crossroads. **Curr Diab Rep**, v. 18, n. 2, 2018.
- DIEHL, R.; FERRARA, F.; MULLER, C.; DREYER, A.Y.; MCLEOD, D.D.; FRICKE, S.; BOLTZE, J. Immunosuppression for in vivo research: state-of-the-art protocols and experimental approaches. **Cell Mol Immunol**, v. 14, p. 146–179, 2017.
- DONATO-TRANCOSO, A.; GONÇALVES, L.; MONTE-ALTO-COSTA, A. DA SILVA, F.A.; SOUZA, B.R. Seed oil of *Joannesia princeps* improves cutaneous wound closure in experimental mice. **Acta Histochem**, v. 116, p. 1169-1177, 2014.
- EDEOGU, C. O.; KALU, M.E.; FAMUREWA, A.C.; ASOGWA, N.T.; ONYEJI, G.N.; IKPEMO, K.O. Nephroprotective effect of *Moringa oleifera* seed oil on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats: biochemical evaluation of antioxidant,

anti-inflammatory and antiapoptotic pathways. **J Am Coll Nutr**, v. 39, n. 4, p. 307-315, 2020.

EDWARDS, J.V.; HOWLEY, P.; DAVIS, R.; MASHCHAK, A.; GOHEEN, S.C. Protease inhibition by oleic acid transfer from chronic wound dressings to albumin. **Int J Pharm**, v. 340, n. 1-2, p. 42-51, 2007.

ERLICH, H.; KRUMMEL, T. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. **Wound Repair Regen**, v. 4, p. 203, 1996.

FALANGA, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. **Lancet**, v. 366, n. 9498, p. 1736-1743, 2005.

FAMUREWA, A.C.; AJA, P.M.; NWANKWO, O.E.; AWOKE, J.N.; MADUAGWUNA, E.K.; ALOKE, C. Moringa oleifera seed oil or virgin coconut oil supplementation abrogates cerebral neurotoxicity induced by antineoplastic agent methotrexate by suppression of oxidative stress and neuro-inflammation in rats. **J Food Biochem**, v. 43, n. 3, p. e12748, 2019.

FERNANDES, E.E.; PULWALE, A.V.; PATIL, G.A.; MOGUE, A.S. Probing regenerative potential of *Moringa oleifera* aqueous extracts using in vitro cellular assays. **Pharmacognosy Res**, v. 8, n. 4, p. 231-237, 2016.

FIDRIANNY, I.; KANAPA, I.; SINGGIH, M. Phytochemistry and pharmacology of Moringa tree: an overview. **Biointerface Res Appl Chem**, v. 11, n. 3, p. 10776-10789, 2021.

FOX, J.D.; BAQUERIZO NOLE, K.L.; BERRIMAN, S.J.; KIRSNER, R.S. Chronic wounds: the need for greater emphasis in medical schools, post-graduate training and public health discussions. **Ann Surg**, v. 264, n. 2, p. 241-243, 2016.

FRYKBERG, R.G.; BANKS, J. Challenges in the treatment of chronic wounds. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v. 4, n. 9, p. 560-582, 2015.

FURMAN, B.L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. **Curr.Protoc.Pharmacol**, v. 70, p. 5.47.1-5.47.20, 2005. .

GALLELLI, G.; CIONE, E.; SERRA, R.; LEO, A.; CITRARO, R.; MATRICARDI, P.; DI MEO, C.; BISCEGLIA, F.; CAROLEO, M.C.; BASILE, S.; GALLELLI, L. Nano-hydrogel embedded with quercetin and oleic acid as a new formulation in the treatment of diabetic foot ulcer: A pilot study. **Int Wound J**, p. 1-6, 2019.

GANESH, G.V.; RAMKUMAR, K.M. Macrophage mediation in normal and diabetic wound healing responses. **Inflamm Res**, v. 69, n. 4, p. 347-363, 2020.

- GOTHAI, S.; ARULSELVAN, P.; TAN, W.S.; FAKURAZI, S. Wound healing properties of ethyl acetate fraction of *Moringa oleifera* in normal human dermal fibroblasts. **J Intercult Ethnopharmacol**, v. 5, p. 1–6, 2016.
- GUEST, J.F.; VOWDEN, K.; VOWDEN, P. The health economic burden that acute and chronic wounds impose on an average clinical commissioning group/health board in the UK. **J. Wound Care**, v. 26, n. 6, p. 292-303, 2017.
- GUIDONI, M.; FIGUEIRA, M.M.; RIBEIRO, G.P.; LENZ, D.; GRIZOTTO, P.A.; DE MELO COSTA PEREIRA, T.; SCHERER, R.; BOGUSZ JR, S.; FRONZA, M. Development and evaluation of a vegetable oil blend formulation for cutaneous wound healing. **Arch Dermatol Res**, v. 311, n. 6, p. 443-452, 2019.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Mol Aspects Med**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.
- GUTIERREZ-FERNANDEZ, A.; INADA, M.; BALBÍN, M.; FUEYO, A.; PITIOT, A.S.; ASTUDILLO, A.; HIROSE, K.; HIRATA, M.; SHAPIRO, S.D.; NOËL, A.; WERB, Z.; KRANE, S.M.; LÓPEZ-OTÍN, C.; PUENTE, X.S. Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). **J FASEB**, v. 21, p. 2580- 2589, 2007.
- HEYER, K.; HERBERGER, K.; PROTZ, K.; GLAESKE, G.; AUGUSTIN, M. Epidemiology of chronic wounds in Germany: analysis of statutory health insurance data. **Wound Repair Regen**, v. 24, p. 434-442, 2016.
- HOQUE, M.; DAVE, S.; GUPTA, P.; SALEEMUDDIN, M. Oleic acid may be the key contributor in the BAMLET-induced erythrocyte hemolysis and tumoricidal action. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e68390, 2013.
- HUTH, P.J.; FULGONI 3rd, V.L.; LARSON, B.T. A systematic review of high-oleic vegetable oil substitutions for other fats and oils on cardiovascular disease risk factors: implications for novel high-oleic soybean oils. **Adv Nutr**, v. 6, n. 6, p. 674-693, 2015.
- IRION, G. **Feridas: Novas Abordagens, Manejo Clínico e Atlas em Cores**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.
- KAO, H.K.; CHEN, B.; MURPHY, G.F.; LI, Q.; ORGILL, D.P.; GUO, L. Peripheral blood fibrocytes: enhancement of wound healing by cell proliferation, re-epithelialization, contraction, and angiogenesis. **Ann Surg**, v. 254, n. 6, p. 1066-1074, 2011.

- KAPP, S.; MILLER, C.; SANTAMARIA, N. The quality of life of people who have chronic wounds and who self-treat. **J. Clin. Nurs.** v. 27, n. 1-2, p. 182-192, 2017.
- KILKENNY, C.; BROWNE, W. J.; CUTHILL, I. C.; EMERSON, M.; ALTMAN, D.G. The ARRIVE guidelines Animal Research: Reporting In Vivo Experiments. **Br J Pharmacol**, v. 160, n. 7, p. 1577-1579, 2010.
- LACETERA, N.; FRANCI, O.; SCALIA, D.; BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; NARDONE, A. Effects on functions of ovine blood mononuclear cells for each of several fatty acids at concentrations found in plasma of healthy and ketotic ewes. **Am J Vet Res**, v. 63, n. 7, p. 958-962, 2002.
- LANIA, B.G.; MORARI, J.; SOUZA, A.L.; SILVA, M.N.D.; DE ALMEIDA, A.R.; VEIRA-DAMIANI, G.; ALEGRE, S.M.; CÉSAR, C.L.; VELLOSO, L.A.; CINTRA, M.L.; MAIA, N.B.; VELHO, P.E.N.F. Topical use and systemic action of green and roasted coffee oils and ground oils in a cutaneous incision model in rats (*Rattus norvegicus albinus*). **PLoS One**, v. 12, n. 12, p. e0188779, 2017.
- LEONE, A.; SPADA, A.; BATTEZZATI, A.; SCHIRALDI, A.; ARISTIL, J.; BERTOLI, S. *Moringa oleifera* seeds and oil: characteristics and uses for human health. **Int J Mol Sci**, v. 17, p. 2141, 2016.
- LEVADA-PIRES, A. C.; CURY-BOAVENTURA, M.F.; GORJÃO, R.; HIRABARA, S.M.; PUGGINA, E.F.; PERES, C.M.; LAMBERTUCCI, R.H.; CURI, R.; PITHON-CURI, T.C. Neutrophil death induced by a triathlon competition in elite athletes. **Med Sci Sports Exerc**, v. 40, n. 8, p. 1447-1454, 2008.
- LIM, H.Y.; MÜLLER, N.; HEROLD, M.J.; VAN DEN BRANDT, J.; REICHARDT, H.M. Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration. **Immunology**, v. 122, n. 1, p. 47-53, 2007.
- LIMA, T.M.; KANUNFRE, C.C.; POMPEIA, C.; VERLENGIA, R.; CURI, R. Ranking the toxicity of fatty acids on Jurkat and Raji cells by flow cytometric analysis. **Toxicol in vitro**, v. 16, n. 6, p. 741-747, 2002.
- LIMA, T.M.; KANUNFRE, C.C.; POMPEIA, C.; VERLENGIA, R.; CURI, R. Ranking the toxicity of fatty acids on Jurkat and Raji cells by flow cytometric analysis. **Toxicol in vitro**, v. 16, n. 6, p. 741-747, 2002.
- LORDANI, T.V.; BREZZAN, M.A.; CORTEZ, L.E.; LORDANI, C.R.; HONDA, P.A.; LONARDONI, M.V.; CORTEZ, D.A. Effect of a topical formulation

containing *Calophyllum brasiliense* Camb. extract on cutaneous wound healing in rats. **Nat Prod Res**, v. 29, n. 10, p. 953-958, 2015.

LOVAZSI, M.; MATTII, M.; EYERICH, K.; GÁCSI, A.; CSÁNYI, E.; KAVÁCS, D.; RUHL, R.; SZEGEDI, A.; KEMÉNY, L.; STÁHLE, M.; ZOUBOULIS, C.C.; EYERICH, S.; TOROCSIK, D. Sebum lipids influence macrophage polarization and activation. **Br. J. Pharmacol**, v. 177, n. 6, p. 1671-1682, 2017.

LOWENBERG, M.; VERHAAR, A.P.; BRINK, G.R.; HOMMES, D.W. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. **TRENDS Mol Med**, v. 13, n. 4, p.158-163, 2007.

LUETRAGOON, T.; SRANUJIT, R.P.; NOYSANG, C.; THONGSRI, Y.; POTUP, P.; SUPHROM, N.; NUENGCHAMNONG, N.; USUWANTHIM, K. Bioactive compounds in *Moringa oleifera* Lam. leaves inhibit the pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide-induced human monocyte-derived macrophages. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 191, 2020.

MACKAY, D.; MILLER, A.L. Nutritional support for wound healing. **Altern Med Rev**, v. 8, n. 4, p. 359-377, 2003.

MACLEOD, A.S.; MANSBRIDGE, J.N. The innate immune system in acute and chronic wounds. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v. 5, n. 2, p. 65-78, 2016.

MAHAJAN, S.G.; MEHTA, A.A. Immunosuppressive activity of ethanolic extract of seeds of *Moringa oleifera* Lam. in experimental immune inflammation. **J Ethnopharmacol**, v. 130, p. 183-186, 2010.

MAHMOUDI, S.; MANCINI, E.; XU, L.; MOORE, A.; JAHANBANI, F.; HEBESTREIT, K.; SRINIVASAN, R.; LI, X.; DEVARAJAN, K.; PRÉLOT, L.; ANG, C.E.; SHIBUYA, Y.; BENAYOUN, B.A.; CHANG, A.L.S.; WERNIG, M.; WYSOCKA, J.; LONGAKER, M.T.; SNYDER, M.P.; BRUNET, A. Heterogeneity in old fibroblasts is linked to variability in reprogramming and wound healing. **Nature**, v. 574, n. 7779, p.553-558, 2019.

MANTOVANI, A.; BISWAS, S.K.; GALDIERO, M.R.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **J Pathol**, v. 229, n..2, p. 176-185, 2013.

MARTIN, P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, p. 75-81, 1997.

MELO, K.C.; MARES, E.K.L.; SAOUZA, D.A.A.; OLIVEIRA, I.S.; GUIMARÃES, S.C.N.; NASCIMENTO, L.A.S.; CONCEIÇÃO, L.R.V.; ZAMIAN, J.R.; ROCHA FILHO, G.N.; COSTA, C.E.F. Estudo dos parâmetros físico-químicos dos óleos

de açaí, andiroba, castanha-do-pará, maracujá e pequi. **58º Congresso Brasileiro de Química**. 2018. Disponível em

<[http://www.abq.org.br/cbq/2018/trabalhos/3/19173566.html#:~:text=o%20%20c3%b3leo%20de%20andiroba%20possui,linol%20\(10%20c93%25\).&text=o%20%20c3%adndice%20de%20iodo%20calculado,e%2074%20c21%20repectivamente](http://www.abq.org.br/cbq/2018/trabalhos/3/19173566.html#:~:text=o%20%20c3%b3leo%20de%20andiroba%20possui,linol%20(10%20c93%25).&text=o%20%20c3%adndice%20de%20iodo%20calculado,e%2074%20c21%20repectivamente)>.

MICHL, C.; VIVARELLI, F.; WEIGL, J.; DE NICOLA, G.R.; CANISTRO, D.; PAOLINI, M.; IORI, R.; RASCLE, A. The chemopreventive phytochemical moringin isolated from *Moringa oleifera* seeds inhibits JAK/STAT signaling. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0157430, 2016.

MINUTTI, C.M.; KNIPPER, J.A.; ALLEN, J.E.; ZAISS, D.M. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. **Semin Cell Dev Biol**, v. 61, p. 3-11, 2017.

MIRZA, R.; KOH, T.J. Dysregulation of monocyte/macrophage phenotype in wounds of diabetic mice. **Cytokine**, v. 56, n. 2, p. 256-264, 2011.

MORTON, J.F. Horseradish tree, *Moringa pteryidosperma* (Moringaceae) – a boon to arid lands? **Econ Bot**, v. 45, n. 3, p. 318-333, 1991.

MUHAMMAD A.A.; PAUZI, N.A.S.; ARULSELVAN, P.; ABAS, F.; FAKURAZI, S. *In vitro* wound healing potential and identification of bioactive compounds from *Moringa oleifera* Lam. **Bio Med Res Int**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

MUHAMMAD, A.A.; ARULSELVAN, P.; CHEAH, P.S.; ABAS, F.; FAKURAZI, S. Evaluation of wound healing properties of bioactive aqueous fraction from *Moringa oleifera* Lam on experimentally induced diabetic animal model. **Drug Des Devel Ther**, v. 10, p. 1715-1730, 2016.

NADEEM, M.; IMRAN, M. Promising features of *Moringa oleifera* oil: recent updates and perspectives. **Lipids Health Dis**, v. 15, p. 212, 2016.

NEWMANN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat Prod Rep**, v. 17, n. 3, p. 215-234, 2000.

NUSSBAUM, S.R.; CARTER, M.J.; FIFE, C.E.; DAVANZO, J.; HAUGHT, R.; NUSGART, M.; CARTWRIGHT, D. An economic evaluation of the impact, cost, and Medicare policy implications of chronic non healing wounds. **Value Health**, v. 21, n. 1, p. 27-32, 2018.

OGUNSINA B.S.; INDIRA T.N.; BHATNAGAR A. S.; RADHA C.; DEBNATH S.; GOPALA-KRISHNA, A.G. Quality characteristics and stability of *Moringa*

oleifera seed oil of Indian origin. **J Food Sci Technol**, v. 51, n. 3, 503-510, 2014.

PADOVESE, R.; CURI, R. Modulation of rat neutrophil function *in vitro* by cis- and trans-MUFA. **Br J Nutr**, v. 101, n. 9, p. 1351-1359, 2009.

PARISOTTO-PETERLE, J.; BIDONE, J.; LUCCA, L.G.; ARAÚJO, G.M.S.; FALKEMBACH, M.C.; DA SILVA, M.M.; HORN, .A.P.; DOS SANTOS, M.K.; DA VEIGA JR, V.F.; LIMBERGER, R.P.; TEIXEIRA, H.F.; DORA, C.L.; KOESTER, L.S. Healing activity of hydrogel containing nanoemulsified β -caryophyllene. **Eur J Pharm Sci**, v. 30, n. 148, p. 105318, 2020.

PARWANI, L.; BHATNAGAR, M.; BHATNAGAR, A.; SHARMA, V.; SHARMA, V. Evaluation of *Moringa oleifera* seed biopolymer-PVA composite hydrogel in wound healing dressing. **Iran Polym J**, v. 25, p. 919-931, 2016.

PEREIRA, L.M.; HATANAKA, E.; MARTINS, E.F.; OLIVEIRA, F.; LIBERTI, E.A.; FARSKY, S.H.; CURI, R.; PITHON-CURI, T.C. Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats. **Cell Biochem Funct**, v. 26, p. 197-204, 2008.

PHILLIPS, C.J.; HUMPHREYS, I.; FLETCHER, J.; HARDING, K.; CHAMBERLAIN, G.; MACEY, S. Estimating the costs associated with the management of patients with chronic wounds using linked routine data. **Int. Wound J**, v. 13, n. 6, p. 1193-1197, 2015.

POHLMAN, T.; STANNESS, K.; BEATY, P. An endothelial cell surface factor(s) induced in vitro by lipopolysaccharide, interleukin 1 and tumor necrosis factor- α increases neutrophil adherence by a CDw18-dependent mechanism. **J Immunol**, v. 136, p. 45-48, 1986.

POPOOLA, J.O.; OBEMBE, O.O. Local knowledge, use pattern and geographical distribution of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) in Nigeria. **J. Ethnopharmacol**, v. 150, p. 682–691, 2013.

RAMACHANDRAN, C.; PETER, K.V.; GOPALAKRISHNANP, K. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose indian vegetable. **Econ Bot**, v. 34, n. 3, p. 276-283, 1980.

RAMALHO, T.; FILGUEIRAS, L.; SILVA-JR, I.A.; PESSOA, A.F.M.; JANCAR, S. Impaired wound healing in type 1 diabetes is dependent on 5-lipoxygenase products. **Sci Rep**, v. 8, p.14164, 2018.

- RATHRIT, B.S.; BODHANKAR, S.L.; BAHETI, A.M.; Evaluation of aqueous leaves extract of *Moringa oleifera* Linn for wound healing in albino rats. **Indian J Exp Biol**, v. 44, n. 11, p. 898-901, 2006.
- REDDY, G. K.; ENWEMEKA, C. S.A simplified method Y for the analysis of hydroxiprolin in biological tissues. **Clin Biochem**, v. 29, p. 225-229, 1996.
- RODERO, M.P.; KHOSROTEHTANI, K. Skin wound healing modulation by macrophages. **Int Clin Exp Pathol**, v. 3, n. 7, p. 643-653, 2010.
- RODRIGUES, H.G.; VINOLO, M.A.R.; MAGDALON, J.; VITZEL, K.; NACHBAR, R.T.; PESSOA, A.F.M.; DOS SANTOS, M.F.; HATANAKA, E.; CALDER, P.C.; CURI, R. Oral administration of oleic or linoleic acid accelerates the inflammatory phase of wound healing. **J Invest Dermatol**, v. 132, p. 208-215, 2012.
- SANCHEZ-MACHADO, D.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; NÚÑEZ-GASTÉLUM, J.A.; DE LA MORA-LÓPEZ, G.S.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J.; PASEIRO-LOSADA, P. Effect of the refining process on *Moringa oleifera* seed oil quality. **Food Chem**, v. 187, p. 53-57, 2015.
- SCHAFER, M.; WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacol Res**, v. 58, n. 2, p. 165-171, 2008.
- SCHWINGSHACKL, L.; HOFFMANN, G. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease: synopsis of the evidence available from systematic reviews and meta-analyses. **Nutrients**, v. 4, p. 1989-2007, 2012.
- SIDDIQUI, R. A.; JENSKI, L.J.; NEFF, K.; HARVEY, K.; KOVACS, R.J.; STILLWELL, W. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in Jurkat cells by a protein phosphatase mediated process. **Biochim Biophys Acta**, v. 1499, n. 3, p. 265-75, 2001.
- SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**, p. 738-746, 1999;
- SMITH, A.N.; MUFFLEY, L.A.; BELL, A.N.; NUMHOM, S.J.; HOCKING, A.M. Unsaturated fatty acids induce mesenchymal stem cells to increase secretion of angiogenic mediators. **J Cell Physiol**, v. 227, n. 9, p. 3225-3233, 2017.
- SMITH, P.C.; MARTÍNEZ, C.; MARTÍNEZ, J.; MCCULLOCH, C.A. Role of fibroblast populations in periodontal wound healing and tissue remodeling. **Front Physiol**, v. 10, p. 270, 2019.

- SMOLA, H.; THIEKOTTER, G.; FUSENIG, N. Mutual induction of growth factor gene expression in by epidermal cell interaction. **J Cell Biol**, v. 122, p. 417, 1993.
- TILOKE, C.; ANAND, K.; GENGAN, R.M.; CHUTURGOON, A.A. *Moringa oleifera* and their phytonanoparticles: potential antiproliferative agents against cancer. **Biomed Pharmacother**, v. 108, p. 457-466, 2018.
- THULABANDU, V.; CHEN, D.; ATIT, R.P. Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. **WIREs Dev Biol**, e307, 2017.
- TOMASEK, J.J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, p. 349-363, 2002.
- TURNER, D. M. Natural product source material use in the pharmaceutical industry: upon drug discovery. **Nat Product Reports**, v. 17, n. 3, p. 215-234, 2000.
- VERLENGIA, R.; GORJÃO, R.; KANUNFRE, C.C.; BORDIN, S.; DE LIMA, T.M.; CURI, R. Effect of arachidonic acid on proliferation, cytokines production and pleiotropic genes expression in Jurkat cells - A comparison with oleic acid. **Life Sci**, v. 73, n. 23, p. 2939-2951, 2003.
- WERDIN, F.; TENENHAUS, M.; RENNEKAMPFF, H.O. Chronic wound care. **Lancet**, v. 372, n. 9653, p. 1860-1862, 2008.
- WITTE, M.; BARBUL, A. General Principles of wound healing. **Surg Clin North Am**, v. 77, p. 509, 1999.
- WOODLEY, D.T. Distinct fibroblasts in the papillary and reticular dermis: implications for wound healing. **Dermatol Clin**, v. 35, p. 95-100, 2017.
- XIAO, X.; WANG, J.; MENG, C.; LIANG, W.; WANG, T.; ZHOU, B.; WANG, Y.; LUO, X.; GAO, L.; ZHANG, L. *Moringa oleifera* Lam and its therapeutic effects in immune disorders. **Front Pharmacol**, v. 11, p. 566783, 2020.
- YAGER, D.; NWOMEH, B. The proteolytic environment of chronic wounds. **Wound repair Regen**, v. 7, p. 433, 1999.
- YUNNA, C.; MENGROU, H.; LEI, W.; WEIDONG, C. Macrophage M1/M2 polarization. **Eur J Pharmacol**, v. 877, p. 173090, 2020.
- ZEN, M.; CANOVA, M.G.; CAMPANA, C.; BETTIO, S.; NALOTTO, L.; RAMPUDDA, M.E.; RAMONDA, R.; IACCARINO, L.; DORIA, A. The

kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. **Autoimmun Rev**, v. 10, n. 6, p. 305-310, 2011.